

Dina Rute Pedro Gomes

**Pesquisa de Cianobactérias, Cianotoxinas e Bactérias
Patogénicas, em Suplementos Alimentares
(Clorela e Spirulina)**

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto

Orientador – Doutor Vítor Vasconcelos

Categoria – Professor catedrático

Afiliação – Departamento de Biologia,
Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto e Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Vítor Vasconcelos, que me “apresentou” pela primeira vez a problemática das cianobactérias conseguindo cativar-me a fazer esta tese. Agradeço-lhe também pela orientação do trabalho.

A todas as pessoas ligadas ao Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE), gostaria de agradecer pelo bom ambiente e por toda a ajuda que cada um deu. Gostaria de agradecer, em particular, à Raquel CB e Ana R. por toda a ajuda que me deram na parte molecular; à Joana pela análise de HPLC; à Micaela pela análise de ELISA; à Bárbara pela ajuda no isolamento e companheirismo; ao Vítor pela ajuda na identificação das cianobactérias, bem como a sua disponibilidade para tirar dúvidas a qualquer momento, assim como a Ana L. e o Anoop.

A toda a minha família, que me ajudou a percorrer este longo caminho até aos dias de hoje.

Aos meus amigos e em especial à minha amiga, Paula Pinho, por me aturar durante a escrita da tese.

A todos um Muito Obrigada!

Resumo

A presente dissertação insere-se no domínio da Medicina Legal e Ciências Forenses e aborda, nos suplementos alimentares (Clorela e Spirulina), a pesquisa/quantificação de cianobactérias, cianotoxinas e bactérias patogénicas.

A importância desta investigação deve-se à presença de casos de intoxicação humana em Portugal e a nível mundial. O grupo de trabalho do Professor Vítor Vasconcelos tem detetado toxinas de cianobactérias em suplementos alimentares vendidos no nosso país o que traduz na necessidade de dar continuidade ao estudo desta problemática.

Neste sentido, foram utilizadas doze amostras de suplementos adquiridas em diferentes Ervanárias no Grande Porto. Nas amostras liofilizadas foram isoladas cianobactérias em meios Z8 e Z8 com NaCl, feita a sua identificação através de análise morfológica por microscopia ótica e molecular por PCR e sequenciação. Para pesquisa de cianotoxinas, foi feita a pesquisa de genes envolvidos na sua produção e a sua deteção e quantificação por HPLC e ELISA.

Por identificação morfológica e molecular foi possível detetar a presença dos géneros *Chlorella* e *Arthrospira*.

O uso de métodos moleculares foram imprescindíveis para detetar cianobactérias e *E. coli* em amostras de Clorela bem como genes codificadores de microcistinas na Spirulina.

Este trabalho laboratorial foi realizado no CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, no Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE), sob a orientação do Professor Dr. Vítor Vasconcelos.

Palavras-chave: Cianobactérias, cianotoxinas, bactérias patogénicas, Clorela, Spirulina, PCR, HPLC, ELISA

Abstract

This thesis falls within the field of Legal Medicine and Forensic Sciences and approaches, in food supplements (Clorela and Spirulina), the research/quantification of cyanobacteria, cyanotoxins and pathogenic bacteria.

The importance of this research is due to the presence of cases of human intoxication in Portugal and worldwide. The working group of Professor Vítor Vasconcelos has detected cyanobacteria toxins in dietary supplements sold in our country which reflects the need to continue the study of this problem.

In this regard, twelve samples of supplements were acquired in different health food stores in Oporto. In the lyophilized samples, cyanobacterias were isolated in medium Z8 and Z8 with NaCl, made their identification through the morphological analysis by an optical microscope, and molecular by PCR and sequencing. To search for cyanotoxins, research was carried out with the genes involved in its production and its detection and quantification was made by HPLC and ELISA.

By morphological and molecular identification it was possible to detect the presence of the genera *Chlorella* and *Arthrospira*.

The use of molecular methods were essential to detect cyanobacteria and *E. coli* in samples of Clorela well as genes coding for microcystin in Spirulina.

This laboratory work was conducted at CIIMAR - Interdisciplinary Centre for Marine and Environmental Research, Laboratory of Ecotoxicology, Genomics and Evolution (LEGE), under the guidance of Professor Dr. Vítor Vasconcelos.

Keywords: cyanobacteria, cyanotoxins, pathogenic bacteria, Clorela, Spirulina, PCR, HPLC, ELISA

Índice

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	1
1.2 - CIANOBACTÉRIAS.....	2
1.2.1 – Abordagem histórica das cianobactérias.....	2
1.2.2 – Caracterização das cianobactérias	4
1.2.3 – Toxicidade das cianobactérias.....	5
1.2.4 – Intoxicações por cianobactérias	9
1.3 - SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	9
1.3.1 – Suplementos alimentares constituídos por microalgas: Clorela e Spirulina	9
1.4 – DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUAS TOXINAS NOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	11
1.5 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANOTOXINAS	12
1.6 - DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGENICAS MAIS COMUNS NOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	14
1.7 - INTOXICAÇÕES ALIMENTARES NO ÂMBITO DA MEDICINA LEGAL	17
2- OBJETIVOS.....	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1- CARATERÍSTICAS DAS AMOSTRAS	19
3.2- TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	20
3.3- IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	22
3.4 – ANÁLISE MOLECULAR.....	22
3.4.1 – Extração do DNA.....	23
3.4.2 – Amplificação por PCR.....	24
3.4.3 – Primers.....	30
3.4.4 – Preparação das amostras para a sequenciação	30
3.5 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANOTOXINAS POR HPLC	31
3.6 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS ELISA PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS.....	32
4- RESULTADOS	33
4.1- IDENTIFICAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS – ISOLAMENTO	33
4.2- RESULTADOS DA ANÁLISE MOLECULAR	43
4.2.1 – Resultados obtidos por PCR	43
4.2.2 – Sequenciação	46
4.3 – RESULTADOS OBTIDOS POR HPLC	50
4.4 – RESULTADOS OBTIDOS POR ELISA.....	50
5- DISCUSSÃO DE RESULTADOS	53
6- CONCLUSÃO	59
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8- ANEXOS.....	67

Índice de Figuras

FIG. 1 - DIAGRAMA DO PLANO DE AMOSTRAGEM E METODOLOGIA LABORATORIAL	20
FIG. 2 - ISOLADOS EM MEIO Z8 E EM MEIO Z8 COM NaCl, EM FRASCOS DE POLIESTIRENO ESTÉREIS DE 50 ML	21
FIG. 3 - ISOLADOS EM AGAR Z8	21
FIG. 4 - MARCADOR 1Kb PLUS (INVITROGEN - FRAGMENTOS DE 100 BP A 12 Kb)	23
FIG. 5 – AMOSTRA C1. NA FIGURA OBSERVA-SE CLORELA E UM FRAGMENTO DE SPIRULINA.	35
FIG. 6 – AMOSTRA C2. NA FIGURA OBSERVA-SE CLORELA.	35
FIG. 7 – AMOSTRA C3. NA FIGURA OBSERVA-SE CLORELA.	35
FIG. 8 – AMOSTRA C4. NA FIGURA OBSERVA-SE CLORELA E UM FRAGMENTO DE SPIRULINA.	36
FIG. 9 E FIG. 10 - AMOSTRA S1. NA FIGURA 9 OBSERVA-SE SPIRULINA E UMA CLORELA; NA FIGURA 10 OBSERVA-SE SPIRULINA E UM FRAGMENTO QUE PERTENCE À ORDEM OSCILLATORIALES.	36
FIG. 11 – AMOSTRA S2. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	36
FIG. 12 – AMOSTRA S3. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	37
FIG. 13 – AMOSTRA S4. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	37
FIG. 14 – AMOSTRA S5. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA E DUAS CLORELA	37
FIG. 15 – AMOSTRA S6. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	38
FIG. 16 - AMOSTRA S7. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	38
FIG. 17 – AMOSTRA S8. NA FIGURA OBSERVA-SE SPIRULINA.	38
FIG. 18 – AMOSTRA S1F. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>LEPTOLYNGBYA</i>	39
FIG. 19 – AMOSTRA S5F. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>NOSTOC</i>	39
FIG. 20 – AMOSTRA S6C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>GLOEOCAPSOPSIS</i>	39
FIG. 21 – AMOSTRA C1F. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>LEPTOLYNGBYA</i>	40
FIG. 22 – AMOSTRA C1C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>CHROOCOCCUS</i>	40
FIG. 23 – AMOSTRA C4C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>CHROOCOCCUS</i>	40
FIG. 24 – AMOSTRA S1F. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>LEPTOLYNGBYA</i>	41
FIG. 25 – AMOSTRA S1C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>GLOEOCAPSOPSIS</i>	41
FIG. 26 – AMOSTRA S4C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>GLOEOCAPSOPSIS</i>	41
FIG. 27 – AMOSTRA S5C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>GLOEOCAPSOPSIS</i>	42
FIG. 28 E FIG. 29 – AMOSTRA S6F. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>NODOSILINEA</i>	42
FIG. 30 – AMOSTRA S6C. NA FIGURA OBSERVA-SE O GÊNERO <i>GLOEOCAPSOPSIS</i>	42
FIG. 31 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>16S rRNA</i> NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS E ISOLADOS	43
FIG. 32 - RESULTADO DA MICROCISTINA OBTIDO POR ELISA NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS, UTILIZANDO O MÍNIMO, A MÉDIA E O MÁXIMO DE CONCENTRAÇÃO INGERIDA/DIA	52

Índice de Tabelas

TABELA I: DIFERENTES ORDENS DA CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE CIANOBACTÉRIAS E A SUA CORRESPONDÊNCIA PARA AS SUBSECÇÕES DA CLASSIFICAÇÃO BACTERIANA E UMA BREVE DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E SUA OCORRÊNCIA NO AMBIENTE (ADAPTADO DE HAANDE S., 2008).....	3
TABELA II: DESCRIÇÃO DOS DIVERSOS TIPOS DE CIANOTOXINAS AQUÁTICAS E OS SEUS GÊNEROS CARACTERÍSTICOS (ADAPTADO DE OSSWALD J., 2002)	6
TABELA III – CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS	19
TABELA IV – MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO/IDENTIFICAÇÃO DO TAXA EM CIANOBACTÉRIAS	24
TABELA V – CIANOTOXINAS, GENES ESPECÍFICOS E RESPECTIVA CODIFICAÇÃO	25
TABELA VI – BACTÉRIAS PATOGENICAS, GENES ESPECÍFICOS E RESPECTIVA CODIFICAÇÃO	25
TABELA VII – GENE ALVO, RESPETIVOS <i>PRIMERS</i> , TAMANHO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E CONDIÇÕES DE PCR	26
TABELA VIII – ORGANISMO ALVO, GENE ALVO, RESPETIVOS <i>PRIMERS</i> , TAMANHO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO E CONDIÇÕES DE PCR	28
TABELA IX – CRESCIMENTO DE CIANOBACTÉRIAS NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS EM MEIO Z8 E MEIO Z8 COM NaCl.....	33
TABELA X – IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS EM MEIO Z8 COM NaCl.....	34
TABELA XI – IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS EM MEIO Z8	34
TABELA XII – RESULTADOS DOS PCR’S DAS TOXINAS MICROCISTINA E NODULARINA E PARA DETECÇÃO DE <i>MICROCYSTIS</i> SPP.	44
TABELA XIII – RESULTADOS DOS PCR’S DAS TOXINAS CILINDROSPERMOPSINA, SAXITOXINA E ANATOXINA-A	44
TABELA XIV – RESULTADOS DOS PCR’S DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS E ISOLADOS (À DATA)	46
TABELA XV – RESULTADOS DA PESQUISA NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O GENE <i>16S rRNA</i> NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS, SEGUNDO O ALGORITMO <i>BLASTn</i>	47
TABELA XVI – RESULTADOS DA PESQUISA NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O GENE <i>16S rRNA</i> NOS ISOLADOS, UTILIZANDO O ALGORITMO <i>BLASTn</i>	48
TABELA XVII – RESULTADOS DA PESQUISA NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA OS GENES ESPECÍFICOS DAS CIANOTOXINAS NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS, UTILIZANDO O ALGORITMO <i>BLASTn</i>	49
TABELA XVIII – RESULTADOS DA PESQUISA NO GENBANK DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA OS GENES ESPECÍFICOS DAS BACTÉRIAS PATOGENICAS NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS, UTILIZANDO O ALGORITMO <i>BLASTn</i>	49
TABELA XIX – RESULTADOS DA MICROCISTINA OBTIDOS POR ELISA, NAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS.....	51

Índice de Abreviaturas

BLASTn – Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide

Bp – base pairs (pares de bases)

CDCP - Center for Disease Control Prevention

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

C. raciborskii – *Cylindrospermopsis raciborskii*

DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LEGE – Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

M. aeruginosa – *Mycrocystis aeruginosa*

MC - LR – Microcistina - LR

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PKS - Poliquétido sintetase

Primers - Oligonucleótidos

PS - Péptido sintetase

RNA – Ácido Ribonucleico

WHO – World Health Organization

1- Introdução

1.1 - Doenças de Origem Alimentar

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença de origem alimentar é definida como “qualquer doença de uma natureza infecciosa ou tóxica que seja, ou que se suspeite ser causada pelo consumo de alimento ou água” (Adams M., 2002).

Embora exista uma larga vigilância promovida pelas entidades governamentais de todo o Mundo no sentido de assegurar a segurança da cadeia alimentar, a ocorrência dessas doenças ainda afetam a saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (Jorge R., 2006).

Cerca de 1,8 milhões de pessoas morrem anualmente com doenças provocadas por alimentos ou água contaminadas (Jorge R., 2006).

A contaminação pode ser classificada em química, física ou biológica. O perigo biológico é a causa mais comum nas doenças de origem alimentar devido à grande facilidade de contaminação associada fundamentalmente às práticas inadequadas de manipulação e armazenamento dos produtos alimentares. Nesta categoria de perigos incluem-se: bactérias, fungos, vírus, parasitas patogénicos e toxinas microbianas (Baptista P., 2003).

As doenças microbianas de origem alimentar podem ocorrer sob duas apresentações clínicas:

- doença infecciosa comumente provocada por bactérias;
- intoxicação de origem química, bacteriana ou através da contaminação de toxinas de origem natural dos próprios alimentos (Soares E., 2007).

A infeção provém da ingestão de alimentos que possuem microrganismos vivos. As intoxicações resultam de toxinas existentes no alimento ingerido mesmo quando o organismo que as originou não esteja presente. A infeção mediada por toxinas dá-se pela sua produção após a ingestão do alimento contaminado por microrganismos capazes de as originar (Baptista P., 2003).

A última análise realizada em 2009 pelos Estados Membros na União Europeia indica 5.550 possíveis surtos de doenças de origem alimentar que afetaram 48.964 pessoas com 4.356 hospitalizações e 46 mortes (Fernandes C., 2011).

Nesse mesmo ano, foram reportados em Portugal, um total de 11 surtos com afetação de 255 pessoas das quais 94 foram hospitalizadas e uma faleceu (Fernandes C., 2011). Considerando a perigosidade destas doenças ao nível da saúde pública, a sua vigilância é crucial para medir tendências e para a introdução de medidas de intervenção e controlo (educação para a saúde, legislação, alterações na produção alimentar e métodos de processamento/manuseamento) (Adams M., 2002).

1.2 - Cianobactérias

1.2.1 – Abordagem histórica das cianobactérias

Dados geológicos, paleontológicos e geoquímicos isotópicos indicam que as cianobactérias já habitam no planeta Terra há mais de 3500 milhões de anos. Porém, estudos com base em biomarcadores de DNA, sugerem que estes microrganismos apenas surgiram à cerca de 2600 milhões de anos. Algumas pesquisas referem que o oxigénio na atmosfera primitiva teve origem nas cianobactérias contribuindo assim para o surgimento de novos organismos aeróbicos (Haande S., 2008).

A taxonomia das cianobactérias é ainda muito controversa, prevalecendo em dois grandes sistemas: botânico e bacteriológico. A organização taxonómica tem como principais caracterizações a morfologia, a bioquímica, a molecular e genética. Apesar da morfologia ser complexa quando comparada com a maioria dos microrganismos procariotas, a taxonomia apenas baseada nas características morfológicas não resulta necessariamente numa classificação filogeneticamente confiável, até porque as cianobactérias variam muito de morfologia de acordo com as diferentes condições ambientais (Brito A. *et al.*, 2012).

Ehrenberg em 1838 foi o primeiro a identificar as cianobactérias e Thuret, em 1875, iniciou a sua primeira descrição taxonómica. De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, Bornet e Flahault em 1886 e Gomont em 1892 descreveram as primeiras monografias taxonómicas destes organismos, considerando-os como um grupo especial de algas verde-azuladas. Esta taxonomia teve como fonte o Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Em 1932 Geitler classificou as cianobactérias em 1300 espécies, 145 géneros, 20 famílias e 3 ordens. Posteriormente, muitos outros autores abordaram este tema com base em critérios botânicos tradicionais, designando-os mais tarde como o sistema de “Geitlerian” (Silva C., 2006).

Entre 1951 e 1981, Drouet reduziu esta classificação para 62 espécies e para 24 géneros. Esta análise teve como base a hipótese de que a maioria dessas espécies eram na realidade “ecophenes” pois demonstravam ter o mesmo genótipo mas diferente fenótipo devido aos diversos estímulos ambientais. Recentes estudos realizados ao nível do DNA provocaram novas oscilações nesta classificação levando a considerá-la insatisfatória para prevalecer como a mais correta (Silva C., 2006). Nos anos 70, R.Y. Stanier e seus colaboradores, realizaram uma nova taxonomia baseada em estudos bioquímicos, moleculares e ultraestruturais de acordo com as observações efetuadas por Cohn (1853). Devido a essa nova classificação mais microbiológica, esse novo sistema taxonómico designado “Stanierian” foi pela primeira vez englobado no Código Bacteriano. (Silva C., 2006)

Atualmente, as cianobactérias são agrupadas em cinco subsecções pelo Código bacteriano correspondentes a quatro ordens segundo o Código de nomenclatura botânica (Tabela I):

Tabela I: Diferentes ordens da classificação botânica de cianobactérias e a sua correspondência para as subsecções da classificação bacteriana e uma breve descrição das principais características morfológicas e sua ocorrência no ambiente (adaptado de Haande S., 2008).

Classificação botânica	Classificação bacteriana	Principais recursos morfológicos, ocorrência e espécies típicas
Ordem Chroococales	Subsecção I	Cianobactéria unicelular que se reproduz por divisão celular binária ou por rebentos numa única célula, em colónias mantidas juntas pela mucilagem ou então por revestimentos laminados. Muitas espécies são planctónicas e contêm vesículas de gás. Elas ocorrem em águas doces bem como em ambientes marinhos. Os géneros típicos são <i>Synechocystis</i> e <i>Microcystis</i> .
	Subsecção II	Algumas espécies podem sempre ou por vezes reproduzirem-se através de pequenas células esféricas que são produzidas por múltiplas divisões das células-mães. Geralmente crescem em ambientes aquáticos anexadas aos substratos. Um género típico é a <i>Pleurocapsa</i> .
Ordem Oscillatoriales	Subsecção III	Filamentosas, maioritariamente unisseriadas. Cianobactérias sem células especiais. Os tricomas normalmente têm uma bainha e muitas espécies têm vesículas de gás. O grupo é ecologicamente diversificado e ocorre em plâncton, bentónica e em habitats periféricos em águas doces e em ambientes marinhos. Os géneros típicos são <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Spirulina</i>

Ordem Nostocales	Subsecção IV	Filamentosas, maioritariamente unisseriadas. Cianobactérias que podem formar células especializadas (heterócitos e acinetos), sendo que algumas podem formar hormogonia (formação de tricomas dotados de mobilidade que dão origem a novos filamentos). Algumas espécies têm vesículas de gás. Elas ocorrem em plâncton, bentónica e habitats periféricos em águas doces ou ambientes marinhos e podem também ser encontradas em ambientes terrestres. Os géneros típicos são <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Nodularia</i> .
Ordem Stigonematales	Subsecção V	Filamentosas, normalmente são cianobactérias multisseriadas ramificadas (verdadeira ou falsa) que podem formar células especializadas (heterócitos e acinetos) e alguma forma de hormogonia. Ocorrem em ambientes aquáticos e terrestres mas normalmente não em plâncton. O género é <i>Fischerella</i> .

1.2.2 – Caracterização das cianobactérias

As cianobactérias, também conhecidas por algas azul-esverdeadas, cianoprocariotas e cianófitas, possuem um variado impacto dentro dos ecossistemas naturais pois colonizam diversos tipos de meios, tanto marinho como terrestre devido à grande versatilidade morfológica e funcional das suas células (Haande S., 2008).

A designação de algas azul-esverdeadas deve-se ao fato da sua estrutura possuir pigmentos de clorofila-a e de ficocianina conferindo deste modo a pigmentação verde-azulada (Haande S., 2008). São essencialmente autotróficas. Possuindo a capacidade de realizarem a fotossíntese através da doação de eletrões fornecidos pela água (Osswald J., 2002). Para a sua sobrevivência apenas necessitam de água, luz, dióxido de carbono e algumas substâncias inorgânicas. Algumas espécies porém, são heterotróficas facultativas podendo crescer no escuro na presença de substratos orgânicos. Outras utilizam o sulfureto como dador de eletrões para realizar a fotossíntese em ambientes anaeróbicos (Haande S., 2008).

As cianobactérias atingem tamanhos que variam entre 1 a 100 µm (Geoffrey A., 2004). Morfologicamente, apresentam-se como unicelulares, filamentosas e filamentosas ramificadas (Bettina C., 2000). Funcionalmente, as cianobactérias podem ter a capacidade de captar o nitrogénio da atmosfera e transformá-lo em amónia através de células modificadas designadas heterócitos; ou possuírem acinetos que são células de resistência que se dividem quando existem condições mínimas para a sua sobrevivência (Osswald J., 2002).

As cianobactérias apesar de serem amplamente encontradas nos mais distintos meios, elas estão preferencialmente distribuídas em locais de água doce como parte do plâncton, com pH entre 6 e 9, temperaturas a rondar os 25°C, altas concentrações de nutrientes (sobretudo nitrogênio, fosforo e carbono orgânico) e em locais bem iluminados (Osswald J., 2002). Sendo também encontradas no solo, em rochas e em relações simbióticas com plantas, fungos e animais (Bettina C., 2000). No entanto são organismos extremamente resistentes à temperatura, salinidade, alcalinidade e luminosidade (Geoffrey A., 2004).

A reprodução das cianobactérias é assexual, maioritariamente por fissão binária. A divisão das espécies filamentosas dá-se pela formação de cadeias de células denominadas tricomas que divergem na sua morfologia, apresentando-se na forma reta, curvilínea ou helicoidal. Em condições adversas, os acinetos (células de resistência) dividem-se quando o ambiente volta a ser favorável (Osswald J., 2002).

1.2.3 – Toxicidade das cianobactérias

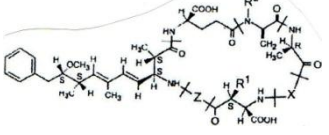
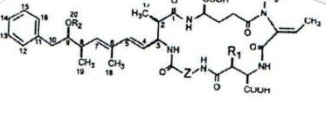
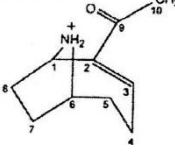
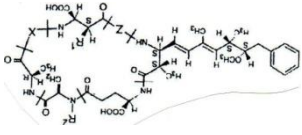
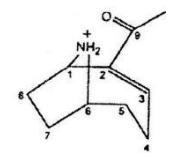
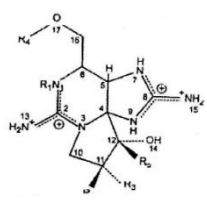
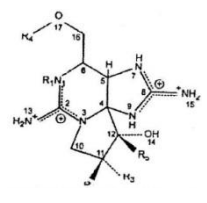
A maioria dos microrganismos segrega substâncias tóxicas ou possuem componentes estruturais que atuam sobre as células provocando alterações funcionais. As toxinas são produtos microbianos capazes de lesar ou matar seres vivos quando administrados em quantidades relativamente pequenas. As toxinas, através de fatores de virulência, podem colonizar um hospedeiro aumentando a capacidade invasiva do microrganismo nos tecidos mais profundos. Deste modo, é mais fácil danificar a integridade e fisiologia do hospedeiro e das suas células, reproduzindo assim, alguns dos sinais clínicos da doença (Appelberg R., Silva N., 1998).

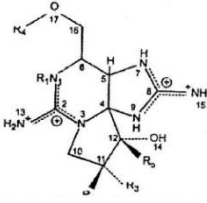
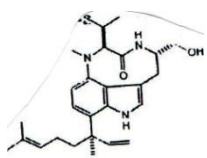
As cianobactérias produzem toxinas com efeitos nefastos tanto nos ecossistemas como os organismos que as ingerem.

Existem espécies capazes de produzir toxinas e a presença de uma espécie já descrita como tóxica não indica, necessariamente a produção destas. Dentro de uma mesma espécie de cianobactérias podem existir estirpes produtoras e não produtoras de toxinas. Segundo Pearson e Neilan (2008), a produção de toxina depende da presença dos genes responsáveis pela produção da mesma.

As toxinas produzidas por cianobactérias são essencialmente de natureza proteica, alcaloide ou são lipopolissacarídeos. De acordo com as suas propriedades toxicológicas podem ser agrupadas em hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas ou irritantes dérmicos (Tabela II).

Tabela II: Descrição dos diversos tipos de cianotoxinas aquáticas e os seus géneros característicos (adaptado de Osswald J., 2002)

Tipo de toxina	Características químicas	Toxina	Órgãos alvo nos mamíferos	Géneros aquáticos produtores
Hepatotoxina	Heptapéptido cíclico; maioria hidrossolúveis; 60 variantes	Microcistina 	Fígado	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaena</i> <i>Anabaenopsis</i>
Hepatotoxina	Pentapéptido cíclico; hidrossolúveis; 2 variantes	Nodularina 	Fígado	<i>Nodularia</i>
Neurotoxina	Alcaloide	Anatoxina-a 	Sinapses	<i>Anabaena</i> <i>Planktothrix</i> <i>Aphanizomenon</i>
Neurotoxina	Alcaloide	Homoanatoxina-a 	Sinapses	<i>Planktothrix</i>
Neurotoxina	Organofosforado	Anatoxina-a(S) 	Sinapses	<i>Anabaena</i>
Neurotoxina	Alcaloide; 16 variantes	Saxitoxina (PSP) 	Axónios	<i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>
Citotoxina	Alcaloide	Cilindrospermopsina 	Fígado, rim, baço, timo, coração	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i>

Citotoxina	Alcaloide	<p>Debromoaplesiotoxina</p> 	Pele Trato intestinal	<i>Schisothrix</i> <i>Planktothrix</i> <i>Lyngbya</i>
Citotoxina	Alcaloide	<p>Lingbiatoxina-a</p> 	Pele Trato intestinal	<i>Lyngbya</i>
Irritante	Lipopolissacarídeos (LPS), muitas variantes	LPS	Irritáveis: afeta qualquer tecido exposto	Todos

As cianotoxinas podem apresentar efeitos crônicos ou agudos mediante o tempo e o grau de exposição. Os mais graves são os péptidos cíclicos porque levam ao aparecimento de cancro nomeadamente, hepático. Os efeitos agudos são maioritariamente as hemorragias e a insuficiência hepática, provocando muitas vezes a morte (Haande S., 2008).

- Hepatotoxinas e Citotoxinas:

As hepatotoxinas são transportadas para o fígado através de transportadores iónicos multiespecíficos existentes no intestino delgado e nos canais biliares. No fígado, este tipo de toxina atrofia os hepatócitos através da inibição das fosfatases proteicas essenciais à sua manutenção provocando, assim, a inacessibilidade do órgão e posterior hemorragia. Se essa lesão não se demonstrar fatal, ocorre irreversibilidade na disfunção hepática. A hemorragia do fígado irá causar consecutivamente, uma falha cardíaca (Głowacka J. *et al.*, 2011).

As hepatotoxinas mais conhecidas são as microcistinas. Mais de 80 microcistinas diferentes foram identificadas. Estas inibem a serina e a treonina-1 e 2A de células eucariotas, importantes para o metabolismo celular. Também atuam como promotoras de

tumores e danificam os hepatócitos causando hemorragias intra-hepáticas, necrose ou destruição parênquimal das células do fígado. Devido à gravidade destas toxinas, a Organização Mundial de Saúde, definiu como valor de concentração máxima de microcistina, 1 µg/L na água potável e 10 µg/L nas águas de recreio (Głowacka J. *et al.*, 2011).

As cianobactérias que produzem a cilindrospermopsina alcaloide cíclica, inibem a síntese de proteínas causando desordens nos rins, coração, timo e baço. Esta toxina também pode ser considerada uma hepatotoxina, pois exerce a sua ação no fígado causando a perda de cromossomas e da cadeia dupla de DNA que leva à formação de tumores hepáticos (Santos P., 2011).

- Neurotoxinas:

As neurotoxinas atuam no sistema nervoso causando a morte por paralisia dos músculos respiratórios. Esse efeito deve-se ao bloqueio do sistema de transmissão de impulsos nervosos entre os neurónios levando à perda de sensibilidade nas extremidades. Outra causa para esta paralisia deve-se à sobre-estimulação dos músculos respiratórios que acabam por extinguir os seus movimentos devido à exaustão. Este excesso de estimulação é provocado pela ligação da toxina aos recetores pós-sinápticos da acetilcolina anulando assim, o efeito de supressão de estímulos (Sivonen K. *et al.*, 1999).

Anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(S) e a saxitoxina são cianotoxinas produzidas por estirpes fixadoras de nitrogénio que provocam alterações prejudiciais no sistema neurológico. A anatoxina-a e a homoanatoxina-a são agentes de bloqueio neuromuscular colinérgico; a anatoxina-a(S) inibe a acetilcolinesterase e a saxitoxina bloqueia os canais de sódio (Sivonen K. *et al.*, 1999).

- Toxinas gastrointestinais e irritantes para a pele:

Os lipopolissacarídeos são constituintes da parede celular que induz nos mamíferos uma excessiva atividade biológica aumentando a resposta inflamatória do organismo afetado levando, por sua vez, à destruição do fígado. Podem também causar irritações na pele, desordens intestinais, choque séptico e até morte (Santos P., 2011).

1.2.4 – Intoxicações por cianobactérias

A exposição a cianobactérias tóxicas é um risco para a saúde pública uma vez que as suas toxinas são potencialmente carcinogénicas e promotoras de distúrbios hepáticos, neurológicos, gastrointestinais e reações alérgicas (Neilan B., 2011). O consumo continuado de pequenas doses de cianotoxinas pode levar a uma maior incidência de cancro na população exposta. Deste modo, é importante que os efeitos crónicos de exposição prolongada por ingestão oral de baixas concentrações sejam avaliados tanto do ponto de vista epidemiológico como toxicológico (Apeldoorn M. *et al.*, 2007).

1.3 - Suplementos alimentares

Atualmente as preocupações dos consumidores sobre os benefícios da sua alimentação na saúde estão a aumentar. Existem na nossa alimentação moléculas sinalizadoras perfeitamente conhecidas pelos seus benefícios no nosso organismo (Alves C. *et al.*, 2008). As vitaminas e os minerais encontram-se entre este tipo de moléculas que desempenham um papel essencial nos processos biológicos, atuando como co-factores para muitas reações bioquímicas, tanto a nível estrutural como a nível funcional. Assim, não é de surpreender que as deficiências de uma ou mais destas substâncias, possam ter um impacto negativo na nossa saúde pública (Márquez S., 2008).

Durante a primeira parte do século XX, vários estudos demonstraram a importância de alguns desses elementos na prevenção de deficiências alimentares e de distúrbios metabólicos, associados a essa carência (Márquez S., 2008).

Com o desenvolvimento da agricultura de cultivo intensivo de alimentos refinados, associados a um estilo de vida pouco saudável, aumentam as deficiências e a importância de uma suplementação indispensável em nutrientes. Daí o aumento significativo do uso de suplementos alimentares por parte dos consumidores (Alves C. *et al.*, 2008).

1.3.1 – Suplementos alimentares constituídos por microalgas: Clorela e Spirulina

As microalgas têm sido utilizadas como suplementos alimentares devido ao seu alto poder nutritivo e à sua larga distribuição (Sergeira V., 2009). Este tipo de suplementos são frequentemente consumidos por longos períodos e em grandes quantidades podendo provocar alterações prejudiciais no organismo se esses produtos estiverem contaminados (Márquez S., 2008).

De facto, torna-se crucial efetuar uma rigorosa monitorização a esses suplementos devido à possível presença de toxinas causadoras de exposições de elevado risco na saúde pública (Sergeira V., 2009).

Numerosos estudos foram realizados nos últimos anos no sentido de determinar o grau de contaminação por toxinas nesses produtos compostos por algas e de avaliar o risco a eles associados. (Sergeira V., 2009)

O género *Chlorella* é uma microalga verde unicelular que habita nas águas doces há mais de dois biliões de anos e é recolhida sob a forma de um caldo espesso de cor verde escura (Jeske M. *et al.*, 2011).

Esta microalga é extremamente nutritiva, rica em proteínas (60% da sua constituição), niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina, colina e vitaminas entre as quais se destacam a A, B1, B2, B6, B12, C, E e K. É também rica em minerais como cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês, ferro, enxofre, iodo, fósforo, potássio, cobalto e selénio. Possui ainda, enzimas, ácidos gordos polisaturados e ácido lipoico (Jeske M. *et al.*, 2011). Tem sido amplamente utilizada para nutrir o organismo, desintoxicar e normalizar a função intestinal, estimular o sistema imunológico e regenerar as células (Jeske M. *et al.*, 2011).

Os suplementos alimentares de Spirulina são constituídos pelo género *Spirulina*. Trata-se de uma cianobactéria filamentosa com forma espiral/helicoidal. Existem numerosos documentos que mencionam esta alga já desde a época da civilização Azteca (Karkos P., 2011).

A Spirulina provém da biomassa seca da *Arthrospira platensis* que é um organismo aeróbio fotossintético distribuído por todo o mundo e encontrado fundamentalmente em águas doces e marinhas. É uma cianobactéria facilmente cultivada e floresce principalmente em lagos alcalinos sob condições controladas (Karkos P., 2011).

Esta cianobactéria tem sido utilizada como fonte de proteínas (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina) minerais (nomeadamente cálcio, potássio e o fósforo) e suplementos vitamínicos, especialmente a vitamina B12, vitamina E e a pro-vitamina A (beta-carotenos). É também rica em compostos fenólicos, ficocianina e ácido linolénico. Para além disso, contribui para aumentar os níveis de energia no organismo porque possui polissacarídeos e gorduras essenciais que são rapidamente absorvidos pelas células humanas. Esta cianobactéria aumenta o número de *Lactobacillus* no interior do intestino cooperando indiretamente na produção de vitamina B6 que auxilia na produção de energia (Ambrosi M. *et al.*, 2008).

1.4 – Detecção de Microrganismos e suas toxinas nos suplementos alimentares

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são aqueles que definem as suas características microbiológicas. Os números e os tipos de microrganismos presentes num produto alimentar podem ser utilizados para avaliar a sua segurança e qualidade microbiológica. A sua segurança é determinada pela presença ou ausência de microrganismos patogénicos ou suas toxinas (Deng R. *et al.*, 2010).

Inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados para analisar as características microbiológicas num produto alimentar.

Atualmente, os métodos moleculares de deteção, identificação e caracterização microbiana tendo como base o seu genótipo, têm sido largamente utilizados (Taveira N., 2000).

A reação de polimerização enzimática em cadeia (PCR) descoberta em 1983 por Kary Mullis, é um método de amplificação dos ácidos nucleicos com grande desenvolvimento e de generalizada utilização (Taveira N., 2000).

O PCR tem vindo a ser estabelecido em diagnósticos microbiológicos numa necessidade de abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos, melhorar a produtividade laboratorial, simplificar o trabalho e reduzir custos. Além destas vantagens, ainda apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade (Oliveira T., 2010).

O método de PCR utiliza um segmento de DNA alvo (de tamanho delimitado através de dois *primers* oligonucleotídicos específicos) para ser amplificado pela DNA polimerase termo-resistente. Esta reação decorre em ciclos sucessivos, 30-40 ciclos, onde ocorre a desnaturação do DNA alvo por aquecimento (92-95°C), a hibridização dos *primers* com as sequências complementares do DNA alvo (50-60°C), e a elongação enzimática dos *primers* (68-72°C) em que a DNA polimerase sintetiza as sequências compreendidas entre os *primers*. Deste modo, como a elongação de um ciclo é utilizada no ciclo seguinte, o número de cópias do segmento de DNA delimitado pelos *primers* duplica teoricamente em cada ciclo de amplificação (Taveira N., 2000).

Dentro das várias técnicas de PCR, as mais comuns são o Multiplex PCR, RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction), Nested-PCR e PCR competitiva.

Na multiplex PCR, dois ou mais segmentos de DNA são utilizados na amplificação sendo utilizado um par de *primers* específico para cada segmento, o que facilita e simplifica algumas análises como os testes de paternidade (Rasmussen J. *et al.*, 2007).

O RT-PCR é um método de amplificação de ácidos nucleicos a partir de moléculas de RNA convertidas em DNA complementar (cDNA) para ser usado como molde na reação de PCR fornecendo, assim, dados qualitativos/quantitativos (Wilson K. *et al.*, 1999).

O Nested-PCR utiliza como molde o primeiro produto amplificado numa reação anterior de PCR. Ou seja, realiza uma re-amplificação a partir de *primers* que se hibridizam no interior do produto da primeira reação (Ouahid Y. *et al.*, 2005).

O PCR competitivo usa o molde de DNA e outra parcela de DNA, de sequência, tamanho e concentrações definidas em que as extremidades são complementares dos *primers* que amplificarão a sequência alvo. O resultado obtido é a amplificação de duas parcelas de DNA nomeadamente o de controlo e o de interesse (Rasmussen J. *et al.*, 2007).

O PCR tem sido uma ferramenta útil na identificação de cianobactérias e na avaliação do seu potencial tóxico pela identificação de genes específicos para cada espécie e de genes envolvidos na produção de toxinas (Oliveira T., 2010).

1.5 – Detecção e quantificação de cianotoxinas

Nos últimos anos verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos para a deteção e quantificação de toxinas nos alimentos.

As cianotoxinas podem ser detetadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (HPLC), Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrómetro de Massas, Espectrometria de Massas Q-TOF, ensaios imunológicos (ELISA) e métodos moleculares que usam oligonucleótidos iniciadores específicos (Lee J. *et al.*, 2008).

É através de métodos cromatográficos como o HPLC que se torna possível a separação de determinadas misturas para que os seus constituintes sejam identificados e quantificados (Lee J. *et al.*, 2008).

Este processo de quantificação funciona basicamente pela adsorção do analito de interesse na fase estacionária repartindo os componentes de uma mistura entre duas fases. O tempo de retenção permite a separação dos vários constituintes que compõem uma determinada amostra: o analito e os seus interferentes (Lee J. *et al.*, 2008).

Na cromatografia líquida, a fase estacionária é constituída por partículas sólidas empacotadas numa coluna, onde é atravessada a fase móvel. São as forças físicas e

químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças determina a resolução e portanto a separação dos solutos individuais (Burtis C. *et al.*, 1996).

O método de HPLC é bastante sensível e pode ser usado como uma ferramenta valiosa no controlo de qualidade para a determinação rápida de amostras liofilizadas (Lee J. *et al.*, 2008).

O teste ELISA baseia-se na reação enzimática e imunoquímica da formação de complexos antígeno-anticorpo.

Este teste, neste caso prático, deteta de uma forma indireta os congêneres das toxinas. Baseia-se no reconhecimento através de anticorpos específicos. A toxina, quando presente numa amostra, é detetada com o aparecimento de uma cor. A intensidade dessa cor é inversamente proporcional à concentração da toxina detetada. Essa concentração é analisada pelo leitor de ELISA (Abraxis).

Este teste é de rápida deteção devido à sua sensibilidade e especificidade, sendo, por isso, amplamente utilizado na pesquisa de toxinas por ser perfeitamente sensível e de fácil manipulação e padronização reforçando, assim, algumas técnicas mais clássicas (Benbrook D., 2002).

Existem vários modelos de ELISA:

- ELISA indireta que utiliza um antígeno aderido à placa sólida. Para que ocorra a formação de complexos antígeno-anticorpo, a substância teste é adicionada a essa placa (Benbrook D., 2002).

- ELISA de bloqueio ou competição que requer a presença de anticorpos que são revelados pela competição com outros anticorpos específicos contra o mesmo tipo de antígenos (Benbrook D., 2002).

Os métodos de HPLC e de ELISA são usualmente utilizados pelas entidades responsáveis pelo controlo da segurança alimentar, no sentido de detetar e quantificar substâncias potenciadoras de elevados riscos na saúde pública.

1.6 - Detecção de bactérias patogénicas mais comuns nos suplementos alimentares

Atualmente, devido à importância de apenas um único microrganismo patogénico poder provocar doenças, torna-se extremamente necessário realizar análises microbiológicas aos alimentos.

- *Escherichia coli*

O género *Escherichia* pertence à família das *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, aeróbios-anaeróbios facultativos, asporogénicos, imóveis/móveis, com flagelos, peritricos, fermentadores da glucose e citocromo-oxidase negativo (Sousa J., 2000).

A *E. coli* cresce entre 4 a 5°C. É capaz de sobreviver em ambientes congelados (-20°C). Temperaturas acima de 60 a 70°C durante 30 minutos inativa a maioria das estirpes. A reprodução é inibida a pH menor que 4.5 ou maior que 9.0 e a concentrações de sal superiores a 8.5% (Sousa J., 2000).

A *Escherichia coli* é produtora de toxinas termo-lábeis e termo-estáveis responsáveis pela patogénese da infeção entérica (Sousa J., 2000).

Existem várias estirpes de *E. coli* entre as quais a estirpe ETEC, responsável pela diarreia do viajante; a estirpe EIEC que destrói o epitélio do colón ocasionando uma diarreia aguda com sangue e leucócitos nas fezes; a estirpe EPEC associada à diarreia do recém-nascido e a estirpe EHEC que provoca colites hemorrágicas, diarreias não sanguinolentas e síndrome hemolítico-urémica. A *E. coli* é também o principal agente etiológico da infeção urinária. O tempo de incubação depende das estirpes em causa (Sousa J., 2000).

- *Salmonella* spp.

A *Salmonella* também pertence à família das *Enterobacteriaceae*.

Esta bactéria provoca uma doença denominada salmonelose, adquirida pela ingestão de alimentos e de água contaminados ou então, por contato fecal-oral. O desenvolvimento desta enfermidade depende na maioria dos casos da ingestão da *Salmonella* (10^6 - 10^9 bactérias). No estômago, a pH 2.0, o número de células viáveis é muito reduzido, porém se houver multiplicação no intestino pode ocasionar gastroenterite aguda, febre entérica ou bacteriemia (Sousa J., 2000).

- *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* pertencem à família das *Pseudomonadaceae*. São bastonetes direitos ou ligeiramente curvos, Gram-negativas, móveis com flagelos polares, aeróbias, não formadoras de endósporos e quimiorganoheterotrófica a pH neutro e temperaturas na gama mesofílica (Sá-Correia I., 2000).

As *Pseudomonas* são agentes patogénicos oportunistas, pois surgem, fundamentalmente em doentes que já anteriormente sofriam de outras doenças ou lesões que levam ao agravamento da infeção, nomeadamente, infeção urinária difícil de erradicar e frequentes após cateterização; infeções em feridas e zonas queimadas; otites crónicas (média e externa); infeção do trato respiratório (em doentes com fibrose quística e em doentes que têm que recorrer a ventiladores) e infeções dos olhos após lesão traumática ou cirúrgica (Sá-Correia I., 2000).

- *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae*. São cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0.5 a 1.5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. Podem agrupar-se em cachos, pares, em cadeias curtas ou cocos isolados. São anaeróbios facultativos capazes de crescerem em meios com elevado teor de cloreto de sódio (10%) e a temperaturas a rondar os 18 a 40°C (Cristino J., 2000).

As estirpes de *S. aureus* são dos agentes mais frequentes de infeções adquiridas. A versatilidade e a gravidade das infeções/intoxicações dependem da grande variedade de toxinas e enzimas produzidas por esta bactéria (Cristino J., 2000).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das mais comuns de origem microbiana. São conhecidas sete enterotoxinas estafilocócicas serologicamente distintas (A, B, C, D, E, G e H) das quais a enterotoxina A é a mais importante. Os sintomas mais comuns neste tipo de intoxicações são os vômitos intensos, diarreia e dores abdominais que surgem cerca de 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (Cristino J., 2000).

- *Campylobacter jejuni*

O *Campylobacter jejuni* pertence à família das *Campylobacteraceae*. Esta bactéria é um bastonete curvo, em espiral ou em forma de S, é Gram negativa, com 0.5 - 5 µm de comprimento e 0.2 – 0.5 µm de largura. Pode adquirir a forma cocóide nas culturas envelhecidas. Não forma esporos. É oxidase positiva. Possui um ou dois flagelos nas

extremidades. Desenvolve-se em microaerofilia, embora existam espécies que se desenvolvem em anaerobiose (Veloso M., 2000).

Esta bactéria é responsável, tanto por surtos, como por casos de gastroenterites. Em indivíduos imunodeprimidos este microrganismo causa infecções extra-intestinais, como meningites, colecistites, infecções do trato urinário, artrite reativa, síndromas de Reiter e de Guillain-Barré (Veloso M., 2000).

As enterites causadas por esta bactéria são manifestadas por hipertermia, vômitos, dores abdominais e diarreia profusa com fezes aquosas ou mucosas e sanguinolentas (Veloso M., 2000).

- *Enterococcus*

Os *Enterococcus* pertencem à família das *Enterococcaceae*. São cocos Gram-positivos apresentando-se isolados, aos pares, em cadeias curtas ou como coco-bacilos. São anaeróbios facultativos, crescendo entre 35 a 37°C embora muitas estirpes cresçam entre 10 a 45°C; todos crescem em caldo com 6.5% de NaCl e hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares. Algumas espécies são móveis (Costa M., 2000).

Estas bactérias causam infecções do trato urinário (cerca de 10% em ambientes não-hospitalares e cerca de 16% das infecções nosocomiais), infecções nas feridas cirúrgicas, endocardites, infecção pélvica ou intra-abdominal, bacteriemias e meningites (Costa M., 2000).

- *Clostridium perfringens*

O *Clostridium perfringens* pertence à família *Clostridiaceae*. É um bacilo Gram-positivo curto, morfologicamente reto, imóvel, aerotolerante, quase sempre capsulado, com esporos ovais subterminais, dificilmente observáveis. Produz uma grande quantidade de gases nos meios líquidos e uma beta-hemólise dupla nos meios com sangue. O seu crescimento é rápido e dissemina-se no meio ambiente através de esporos fundamentalmente responsáveis pela infecção exógena (Ramos M., 2000).

As toxinas produzidas possuem propriedades letais, hemolíticas e necrosantes. Podem causar também agregação plaquetária, lise e trombose dos capilares locais. Deste modo, esta bactéria provoca fasceíte necrosante (gangrena gasosa). Os tecidos afetados têm um aspeto muito característico: pele eritematosa, inchada, com dor intensa local, com bolhas gasosas devido à formação de gás, podendo evoluir depois para a

necrose, destruição dos músculos, insuficiência respiratória, choque séptico, CID e até morte (Ramos M., 2000).

1.7 - Intoxicações Alimentares no Âmbito da Medicina Legal

Uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade ao nível mundial são as intoxicações agudas de origem alimentar (Abreu A., 2013).

O consumo de alimentos contaminados e de água imprópria podem provocar doenças, causando anualmente a morte a cerca de 1,8 milhões de pessoas. A maioria destas enfermidades provém de gastroenterites (Guia C. 2012).

Esse número tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos cujas causas terão raízes sociais, económicas e de desenvolvimento tecnológico, estando associado à falta de controlo higiénico na produção, manuseamento e manutenção dos alimentos (Abreu A., 2013).

Na maioria dos casos, as intoxicações são curáveis, porém algumas mais graves poderão levar à morte (Abreu A., 2013).

Estima-se que aproximadamente 90% das doenças transmitidas através dos alimentos sejam causados por microrganismos (Guia C., 2012).

O Center for Disease Control Prevention (CDCP) indica que nos Estados Unidos da América as doenças originárias dos alimentos provocam cerca de 76 milhões de doentes, 325.000 internamentos e 5000 mortes por ano (Guia C., 2012).

As mortes por intoxicações são uma das causas mais comuns na investigação forense, deste modo, torna-se imprescindível proceder à promoção de estudos ao nível dos produtos alimentares de forma a assegurar a fiabilidade da segurança alimentar.

2- Objetivos

Na presente dissertação foram realizadas técnicas laboratoriais no sentido de detectar cianobactérias, cianotoxinas e bactérias patogénicas nos suplementos alimentares, Clorela e Spirulina.

Para tal, utilizou-se a amplificação por PCR com posterior sequenciação. Os métodos cromatográficos (HPLC) e imunológicos (ELISA) serviram como prova e quantificação para a presença de cianotoxinas.

São objetivos desta dissertação:

- isolamento e identificação de cianobactérias nos suplementos alimentares (*Chlorella* spp. e *Spirulina* spp.) utilizando microscopia ótica e técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciação);
- Pesquisa e identificação de cianotoxinas através de técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciação);
- Pesquisa de bactérias patogénicas através de técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciação);
- Detecção e quantificação de cianotoxinas por cromatografia (HPLC) e pelo ensaio imunológico (ELISA).

3- Materiais e métodos

3.1- Características das Amostras

Doze amostras de suplementos alimentares (quatro de *Chlorella* e oito de *Spirulina*) de diferentes marcas foram adquiridas em Ervanárias na região do Grande Porto no mesmo período de tempo.

Destas doze amostras, duas apresentavam-se em pó, quatro em cápsulas e seis em comprimidos como demonstrado na tabela seguinte.

Tabela III – Características das amostras

Nome	Produtor	Quantidade por comprimido/saco	Quantidade utilizada	Lote	Validade	Código
<i>Chlorella</i> em Pó (100%)	Iswari	70g	30g	WE12060011	02/2014	C1
<i>Chlorella</i> (100 cápsulas)	Solgar	520mg	30 cápsulas	447107-01	07/2015	C2
<i>Chlorella</i> (100 cápsulas)	Nature's Way	410mg	30 cápsulas	B2 108855	02/2015	C3
<i>Chlorella</i> (200 comprimidos)	Be-Life	500mg	50 comprimidos	120600133	03/2014	C4
<i>Spirulina</i> em Pó (100%)	Iswari	125g	30g	WE12080022	03/2014	S1
<i>Spirulina</i> (90 cápsulas)	Naturmil	400mg	30 cápsulas	61243	09/2016	S2
<i>Spirulina</i> (100 comprimidos)	Solgar	750mg	25 comprimidos	442622-02	02/2015	S3
<i>Spirulina</i> (180 comprimidos)	Marcus Rohrer	300mg	60 comprimidos	5208	01/2013	S4
<i>Spirulina</i> (100 comprimidos)	Biover	400mg	50 comprimidos	J026 1011	05/2015	S5
<i>Spirulina</i> (100 cápsulas)	Solaray	410mg	30 cápsulas	151908	02/2015	S6
<i>Konjac e Spirulina</i> (60 comprimidos)	Magriform	140mg	40 comprimidos	E 2012	11/2015	S7
<i>Spirulina</i> (60 comprimidos)	Eladiet	200mg	60 comprimidos	G59	06/2016	S8

Todos estes produtos alimentares (tabela III) encontravam-se hermeticamente fechados e dentro do prazo de validade.

3.2- Tratamento das amostras

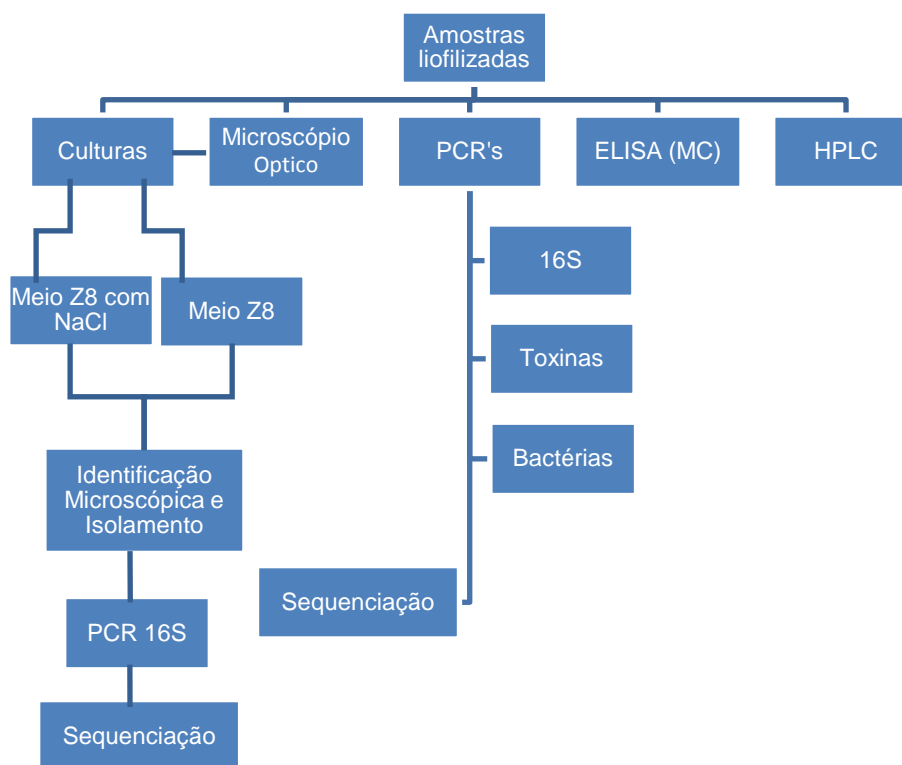


Fig. 1 - Diagrama do plano de amostragem e metodologia laboratorial

Alíquotas com cerca de 30 g de cada amostra foram pesadas assepticamente e reduzidas a pó com o auxílio de um almofariz e pilão.

Foi adicionado cerca de 15 ml de meio Z8 (Kotai, 1972), em frascos de poliestireno esterilizado de 50 ml.

Dessas 30 g de amostras foram transferidos cerca de 0,01 g para o frasco de poliestireno esterilizado onde foram adicionados 15 ml de meio Z8. (figura 2)

O mesmo procedimento foi repetido para a adição de 15 ml de meio Z8 com NaCl (30 g/L). (figura 2)



Fig. 2 - Isolados em meio Z8 e em meio Z8 com NaCl, em frascos de poliestireno estéreis de 50 ml

Estes foram posteriormente acondicionados numa sala de culturas sob a luz artificial (lâmpadas fluorescentes Philips, 40 W), a $25\pm^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo de 14h dia / 10h noite durante 8 meses.

Para o isolamento utilizou-se um microscópio ótico com ampliação 40x e pipetas Pasteur estiradas à chama da lamparina. Estas foram sucessivamente lavadas em gotas de água destilada até completa libertação de contaminantes visíveis.

As colónias isoladas foram ressuspensas num novo meio Z8 correspondente ao meio que determinou o seu crescimento.

Como forma de duplicar o método de isolamento, foi inserida uma gota de amostra com colónias isoladas espalhadas, com o auxílio de uma ansa sobre uma placa de Petri de poliestireno estéril de 60 mm de diâmetro com meio agar Z8 ou meio agar Z8 com NaCl, conforme o crescimento. (figura 3)



Fig. 3 - Isolados em agar Z8

Após o seu crescimento, as colónias foram inoculadas para meio líquido Z8 em frascos de poliestireno esterilizados de 50 ml.

Efetuuou-se sucessivas inoculações nos respetivos meios Z8 até obter culturas unialgais.

As condições de aclimatização foram mantidas durante todo o crescimento.

Para assegurar a inexistência de contaminações algais/fúngicas todo este processo foi periodicamente observado ao microscópio ótico.

Sempre que se obteve uma cultura pura, as colónias foram fotografadas, com recurso a um sistema composto por um microscópio ótico Leica DMLB associado a uma câmara Leica ICCA, com o Software Leica Q Win colour.

3.3- Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada através da sua visualização ao microscópio ótico e com o auxílio dos manuais *Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales; Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales; Cyanoprokaryota 2. Teil/2nd part: Oscillatoriales*.

Para validar a identificação de cianobactérias procedeu-se à sequenciação molecular com o gene *16S rRNA* através do método de PCR.

3.4 – Análise molecular

O PCR foi utilizado na deteção de genes específicos para cianobactérias (amostras liofilizadas e isolados obtidos), genes codificadores de cianotoxinas (amostras liofilizadas) e de bactérias patogénicas (amostras liofilizadas e isolados à data).

3.4.1 – Extração do DNA

- Amostras liofilizadas

Mediu-se cerca de 0,01 g de liofilizados para um *ependorf* de 1,5 ml e foi utilizado o kit “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen, lote 893861), tendo sido seguido as indicações do fabricante para a extração do DNA genómico. Durante o procedimento, foi usado a centrífuga Eppendorf 5415R e a placa de aquecimento com agitação Eppendorf Thermomixer Compact. Para a realização da eluição do preparado, adicionou-se 50 µl de tampão.

A presença de DNA genómico foi confirmado por eletroforese num gel de agarose (Ultrapure™ Agarose, Invictrogen) a 1,5% seguindo os procedimentos *standard* da eletroforese (Davis *et al.*, 1994) utilizando uma solução de tampão de Tris-Acetato EDTA (TAE 1%, BioRad-40mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,3).

A voltagem aplicada dependeu do tamanho do gel, variando entre 80 a 100 V, num período de 30 a 45 minutos. Ao gel de agarose foi adicionado entre 1 a 3 µl de brometo de etídio (BioRad) de uma solução stock de 10 mg/ml. Nos poços de gel foram carregados 5 µl de DNA e 1 µl de tampão de carregamento a 1x (nucleic acid sample loading buffer 5x, BioRad – 50mM Tris-HCL, pH 8, 25% Glicerol, 5 mM EDTA, 0.2% Azul de Bromofenol e 0.2% xylene cyanol FF).

O marcador utilizado ao longo do trabalho foi o 1Kb plus DNA Ladder da Invitrogen (fragmentos de 100 bp a 12 Kb) (figura 4).

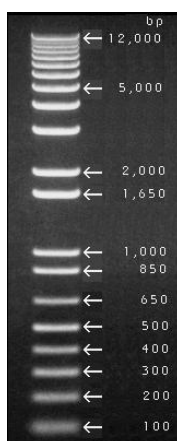


Fig. 4 - Marcador 1Kb plus (Invitrogen - fragmentos de 100 bp a 12 Kb)

A imagem do gel foi fotografada recorrendo a um transiluminador CSL-MICRODOC System (Cleaver Scientific Ltd.) sob influência de luz ultravioleta, acoplado a uma câmara Cannon PowerShot G9.

- Isolados

Retirou-se uma alíquota com algumas colónias de cada amostra com o respetivo meio Z8 e transferiu-se para os vários *eppendorfs*, tendo procedido depois a uma centrifugação e posterior extração de DNA com o kit “PureLink Genomic DNA Mini Kit” seguindo o mesmo protocolo utilizado para a extração das amostras liofilizadas.

3.4.2 – Amplificação por PCR

Para cada par de *primers* foram realizadas reações de PCR num volume final de 20 µl. Os reagentes foram obtidos através da Promega (Madison WI, USA) e cada reação de PCR continha: 1x GoTaq buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 10.0 pmol de cada *primer*, 125 µM de dNTP's, 0.5 U de GoTaq^R Flexi DNA polimerase e 10 ng de DNA tanto das amostras liofilizadas como dos isolados.

A tabela seguinte indica os marcadores moleculares utilizados para a deteção/identificação do taxa em cianobactérias:

Tabela IV – Marcadores Moleculares para Deteção/Identificação do Taxa em Cianobactérias

Genes	Codificação
<i>16S rRNA</i>	rRNA (pequena subunidade ribossomal); fragmento específico para cianobactérias
<i>rpoC1</i>	Enzima RNA polimerase; específico para <i>Microcystis</i> spp. (<i>primers</i> RPOCM ver tabela VII)
<i>rpoC1</i>	Enzima RNA polimerase; específico de <i>C. raciborskii</i> (<i>primers</i> CYL ver tabela VII)
<i>gyrB</i>	DNA girase subunidade B; específico para <i>Microcystis aeruginosa</i>

A tabela seguinte indica os genes específicos das cianotoxinas e respetivas funções codificantes:

Tabela V – Cianotoxinas, genes específicos e respetiva codificação

Cianotoxinas	Genes Específicos	Codifica
Microcistina	<i>mcyA</i>	Enzima não ribossomal péptido sintetase
	<i>mcyB</i>	Enzima não ribossomal péptido sintetase
	<i>mcyC</i>	Enzima não ribossomal péptido sintetase
	<i>mcyD</i>	Enzima Poliquétido Sintetase
	<i>mcyG</i>	Enzima Poliquétido Sintetase
	<i>mcyE</i>	Enzima Poliquétido Sintetase
Cilindrospermopsina	<i>PS</i>	Enzima Peptido Sintetase
	<i>PKS</i>	Enzima Poliquétido Sintetase
	<i>AMT</i>	Enzima Amidinotransferase; específico para Cilindrospermopsina
Nodularina	<i>nda F</i>	Enzima nodularina sintetase
Anatoxina-a	<i>anaC</i>	Enzima anatoxina-a sintetase
Saxitoxina (PSP)	<i>sxtI</i>	Enzima biossíntese da saxitoxina

Numerosos ensaios de amplificação por PCR são aplicados na deteção de bactérias patogénicas nos mais variados alimentos. Os alvos de amplificação estão referenciados na tabela VI.

Tabela VI – Bactérias patogénicas, genes específicos e respetiva codificação

Microorganismo alvo	Genes específicos	Codifica
<i>Escherichia coli</i>	<i>GADAB</i>	Enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD)
<i>Salmonella spp</i>	<i>INVA</i>	Invasão da proteína A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>PAL1</i>	Enzima fenilalanina amónia liase (FAL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>aroA</i>	Enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hip-O</i>	Enzima hipuricase
<i>Enterococcus</i>	<i>tuf</i>	Fator de elongação EF-Tu (participa na síntese de proteínas)
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpa</i>	Toxina α (proteína)

Os controlos negativos foram sempre efetuados com água destilada estéril e os controlos positivos das cianotoxinas estão descritos na tabela seguinte:

Tabela VII – Gene alvo, respectivos *primers*, tamanho do fragmento amplificado e condições de PCR

Gene alvo	Par de Primers	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho (bp)	Controles Positivos*	Reação de PCR				Referência	
					Desnaturação inicial	Ciclo de PCR* ¹				Extensão Final
16S <i>rRNA</i>	cya 106F cya781R	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT	675	Estirpe LEGE 00063	95°C 5 min	35 vezes 95°C 45s 56°C 30s 72°C 30s			72°C 5 min	(Nübel <i>et al.</i> , 1997)
<i>mcyA</i>	mcyA-Cd1F mcyA-Cd1R	AAAATTTAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTCATTAGCGGCTCAT	297	Estirpe LEGE 00063	92°C 2 min	35 vezes 92°C 20s 56°C 30s 72°C 60s			72°C 5 min	Modificado de Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
<i>mcyB</i>	mcyB2959F mcyB3278R	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAACAATATGATAAGCTAC	320	Estirpe MN	92°C 2 min	35 vezes 92°C 20s 56°C 30s 72°C 60s			72°C 5 min	Modificado de Nonneman e Zimba, 2002
<i>mcyC</i>	PSCF1 PSCR1	GCAACATCCCAAGAGCAAAG CCGACAACATCACAAAGGC	674	Estirpe LEGE 00063	94°C 5 min	35 vezes			72°C 7 min	(Ouahid <i>et al.</i> , 2005)
<i>mcyD</i>	PKDF1 PKDR1	GACGCTCAAATGATGAAAC GCAACCGATAAAAACTCCC	647	Estirpe LEGE 00063		95°C 60s	52°C 30s	72°C 60s		
<i>mcyG</i>	PKGf1 PKGR1	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC AATCGCTAAAACGCCACC	425	Estirpe LEGE 00063						
<i>mcyE</i> / <i>ndaF</i>	HEPF HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGCCATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472	Estirpe LEGE 00063	92°C 2 min	40 vezes 92°C 20s 52°C 30s 72°C 60s			72°C 5 min	(Jungblut e Neilan, 2006)
<i>rpoC1</i>	RPOCM61F RPOCM624R	GGAAATGGATGGGTTATTCTGC TAAACCATCCATTCTGCCTC	580	Estirpe LEGE 00063	95°C 10 min	35 vezes 94°C 45s 55°C 45s 72°C 60s			72°C 5 min	(Valério <i>et al.</i> , 2009)
<i>gyrB</i>	gyrF gyrR	GGACGTTTACGAGAACTAGCCTA GGTCTTGGTTTGTCCCTCAA	416	Estirpe IZ3	94°C 3 min	40 vezes 96°C 60s 60°C 60s 72°C 30s			72°C 5 min	(Tanabe <i>et al.</i> , 2007)
<i>rpoC1</i>	CYL2 CYL4	GGCATTCTAGTTATATTGCCATACTA GCCCGTTTTGTCCCTTTGCTGC	308	Estirpe 97047	95°C 2 min	35 vezes 95°C 90s 45°C 30s 72°C 50s			72°C 7 min	(Wilson <i>et al.</i> , 2000)
PS	M13 M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAACATCGCTCACTGGTG	597	Estirpe 97047	95°C 2 min	35 vezes 95°C 90s 55°C 30s 72°C 50s			72°C 7 min	Modificado de Schembri <i>et al.</i> , 2001

<i>PKS</i>	PKS M4 PKS M5	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA AATCCTTACGGGATCCGGTGC	650	Estirpe 97047	95°C 2 min	35 vezes			72°C 7 min	(Schembri <i>et al.</i> , 2001)
						95°C 90s	55°C 30s	72°C 50s		
<i>PKS</i>	K18 M4	CCTCGCACATAGCCATTTGC GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	422	Estirpe 97047	94°C 10 min	30 vezes			72°C 7 min	(Schembri <i>et al.</i> , 2001; Fergusson e Saint, 2003)
						94°C 30s	45°C 30s	72°C 60s		
<i>AMT</i>	AMTF AMTR	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG TTAGGGAAGTAATCTTCACAG	1105	Estirpe AQS RT	94°C 3 min	30 vezes			72°C 7 min	(Kellmann <i>et al.</i> , 2006)
						94°C 10s	50°C 20s	72°C 60s		
<i>sxtI</i>	SXTI682F SXTI877R	GGATCTCAAAGAAGATGGCA GCCAAACGCAGTACCACTT	200	LMECYA 040	94°C 3 min	35 vezes			72°C 7 min	(Lopes <i>et al.</i> , 2012)
						94°C 10s	52°C 20s	72°C 60s		
<i>sxtI</i>	sxtI-F2 sxtI-R	GGATCTCAAAGAAGATGGCA GGTTCGCCGCGGACATTAAA	991	LMECYA 040	95°C 5 min	30 vezes			72°C 7 min	(Brito <i>et al.</i> , 2012; Kellman <i>et al.</i> , 2008)
						94°C 10s	52°C 20s	72°C 60s		
<i>anaC</i>	anaC-genF anaC-genR	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT CCCAATAGCCTGTCATCAA	366	LEGE X- 002	94°C 2 min	35 vezes			72°C 5 min	(Rantala-Ylinen <i>et al.</i> 2011)
						94°C 30s	58°C 30s	72°C 30s		
<i>anaC</i>	anxgenF anxgenR	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG CGACTCTTAATCATGCGATC	861	LEGE X- 002	94°C 3 min	35 vezes			72°C 5 min	(Rantala-Ylinen <i>et al.</i> 2011)
						94°C 10s	52°C 20s	72°C 60s		

*¹ - a primeira coluna diz respeito à desnaturação, a segunda ao emparelhamento e a terceira à extensão

* - LEGE 00063 - DNA da estirpe *Microcystis aeruginosa*; Estirpe MN – DNA da estirpe *Microcystis* spp.; Estirpe IZ3 – DNA da estirpe *Microcystis* spp.; LEGE 97047 – DNA da estirpe *Cylindrospermopsis raciborskii*; Estirpe AQS RT - DNA da estirpe *Cylindrospermopsis* spp.; LMECYA 040 – DNA da estirpe *Aphanizomenon gracile*; LEGE X-022 – DNA da estirpe *Anabaena* sp.;

Tabela VIII – Organismo alvo, gene alvo, respetivos *primers*, tamanho do fragmento amplificado e condições de PCR

Organismo alvo	Gene alvo	Par de Primers	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho (bp)	Reação de PCR				Referência	
					Desnaturação inicial	Ciclo de PCR*				Extensão final
<i>Escherichia coli</i>	GADAB	GADA/BF GADA/BR	ACCTGCGTTGCGTAAATA GGGCGGGAGAAGTTGAT	670	94°C 2 min	35 vezes			72°C 7 min	(Abd-El-Haleem, 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAL1	PAL1F PAL1R	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	504		94°C 30s	51°C 30s	72°C 60s		
<i>Salmonella spp.</i>	INVA	INVAF139 INVAR141	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAAC	284						
<i>Staphylococcus aureus</i>	aroA	FA1 RA2	AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC CACAAGCAACTGCAAGCAT	1153	94°C 2 min	40 vezes			72°C 10 min	(Marcos <i>et al.</i> , 1999)
						92°C 60s	58°C 60s	72°C 90s		
<i>Campylobacter jejuni</i>	hip-O	hipO-F hipO-R	GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA	344	94°C 6 min	35 vezes			72°C 3 min	(Persson and Olsen 2005)
						94°C 50s	57°C 40s	72°C 50s		
<i>Enterococcus</i>	tuf	Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	95°C 3 min	35 vezes			72°C 7 min	(Ke <i>et al.</i> , 1999)
						95°C 30s	55°C 30s	72°C 60s		
<i>Clostridium perfringens</i>	cpa	cpa-F cpa-R	GCTAATGTTACTGCCGTTGACC TCTGATACATCGTGTAAG	324	95°C 5 min	35 vezes			72°C 10 min	(Penha <i>et al.</i> , 2005)
						94°C 60s	53°C 60s	72°C 60s		

*- a primeira coluna diz respeito à desnaturação, a segunda ao emparelhamento e a terceira à extensão

As reações decorreram no termociclador (Biometra Profissional Thermocycler). O volume de reação utilizado tanto na análise *simplex* como *multiplex* manteve-se nos 20 µl.

Os produtos de PCR foram armazenados a 4°C até se proceder à electroforese.

A análise dos produtos de PCR foi realizada por electroforese em gel de agarose a 1,5%, tendo sido utilizadas as mesmas condições que para a visualização do DNA genómico.

Sempre que não se tinha a certeza de que tivesse ocorrido a amplificação ou que esta se apresentava muito ténue no gel de agarose era efetuado um *nested*-PCR, ou seja, realizava-se uma reação de PCR utilizando como *template* não o DNA genómico inicial, mas sim o produto da amplificação do PCR.

As condições da reação da *nested*-PCR foram as mesmas que para a do PCR utilizado.

- Análise do gene *16S rRNA* nas amostras:

A análise de PCR foi realizada em primeiro lugar para o par de *primers* 106/781R (tabela VII), com o objetivo de amplificar um fragmento de 675 bp do *16S rRNA* partilhado por todas as cianobactérias (tabela VII).

Este procedimento serviu como controlo positivo para os PCR posteriores.

Após a confirmação da presença das cianobactérias procedeu-se a ensaios por forma a determinar a existência de principais grupos deste microrganismo produtores de cianotoxinas.

- Pesquisa de genes envolvidos na produção de cianotoxinas:

A pesquisa dos genes (*mcyC*, *mcyD* e *mcyG*) codificadores das cianotoxinas foi realizada em amostra liofilizadas, através do método PCR *multiplex* (Quahid *et al.*, 2005 e Quahid e del Campo, 2009) (tabela VII).

A pesquisa dos restantes genes foi efetuada segundo o PCR simples (tabela VII).

- Pesquisa de bactérias patogénicas:

A pesquisa dos genes codificadores da *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus* e *Clostridium perfringens* foi efetuada em amostras liofilizadas e em isolados de cianobactérias à data da realização do PCR (tabela VIII).

E. coli, *Pseudomonas aeruginosa* e a *Salmonella* spp. foram executadas por PCR *multiplex*, tendo as restantes bactérias sido efetuadas por PCR simples.

Não foram utilizados controlos positivos devido à sua inexistência no laboratório.

3.4.3 – Primers

Nas reações de PCR foram utilizados *primers* específicos para os genes codificadores de cianobactérias, cianotoxinas e bactérias patogénicas, conforme pode ser observado nas tabelas VII e VIII.

3.4.4 – Preparação das amostras para a sequenciação

Todas as amostras amplificadas pelo método de PCR foram selecionadas de acordo com o fragmento codificante e posteriormente preparadas para efetuar a sua sequenciação.

Foi realizada uma nova amplificação dos fragmentos de genes específicos para um volume de 40 µl de forma a proceder à sua sequenciação.

Para tal, manteve-se a mesma proporção de reagentes de modo a efetivar esta reação.

Após a reação, os produtos foram excisados e purificados recorrendo ao kit “Cut & Spin Gel Extraction Columns” (Grisp, lote 893861), de acordo com as informações do fabricante no protocolo do produto.

A amplificação foi validada através da electroforese em gel de agarose.

As amostras a sequenciar foram enviadas para a empresa MacroGen juntamente com 5 µl dos respetivos *primers*.

O *assemble* das sequências (*Forward* e *Reverse*) foi realizado no Geneious e as ambiguidades foram observadas e escrutinadas individualmente com a ajuda dos cromatogramas.

3.5 – Detecção e quantificação de cianotoxinas por HPLC

- Preparação das Amostras e Metodologia para pesquisa de Microcistina

Mediu-se aproximadamente 200 mg num tubo de vidro e adicionou-se metanol a 50%, com volume suficiente para assegurar a homogeneização (5 ml), tendo efetuado duas amostragens. Posteriormente a solução foi submetida a ultrassons (Vibra Cell – Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA), durante 5 minutos a 60 Hz, num banho de gelo, tendo efetuado intervalos a cada minuto. As amostras foram transferidas para tubos de Falcon (15ml) e foram centrifugadas (Survall Legend RT Centrifuge da Thermo Electron Corporation) a uma velocidade de 4995 g durante 10 minutos à temperatura de 4°C (até à obtenção de uma solução límpida). Efetuou-se uma segunda extração do *pelet* resultante e ambos os sobrenadantes foram colocados em gobelés, tapados com *parafilm* e alumínio e foram mantidos durante a noite no frigorífico (4°C). No dia seguinte, transferiu-se as amostras para os Falcon e adicionou-se 1 ml de solvente de extração para remover o *pelet* todo, tendo-se centrifugado os Falcon novamente a uma velocidade de 4995 g durante 10 minutos a 4°C, e adicionados os sobrenadantes. O sobrenadante foi concentrado no Speedvac (Labconco) até a evaporação total. A amostra foi depois ressuspendida em 1,5 ml de metanol (50%) e colocada num vial de HPLC.

As frações purificadas de MC - LR foram então quantificadas no sistema de HPLC numa coluna de terminação protegida Merck Lichrospher RP - 18 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm) equipado com uma coluna de guarda (4 x 4 mm, 5 µm), ambos mantidos a 45°C. A gama de PDA foi de 210-400 nm com um comprimento de onda fixo de 238 nm. O gradiente de eluição linear consistiu em (A) MeOH + 0,1% de ácido trifluoroacético e (B) de H₂O + 0,1 % de TFA (55 % de A e 45 % a 0 min., 65 % A e 35 % B em 5 min., 80 % A e 20% de B em 10 min., 100 % de A em 15 min., 55 % A e 45 % B em 15.1 e 20 min.) com um caudal de 0.9 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL. O MC - LR foi identificado por comparação do espectro e tempo de retenção com um padrão de MC - LR (lote nº 018K1209, 10.025 µg/mL em MeOH, 98 % de pureza, Cyano Biotech GmbH, Berlim). O sistema foi calibrado usando um conjunto de sete diluições padrão de MC - LR (0.5 a 20 µg mL⁻¹) em metanol 50 %. O tempo de retenção do pico de MC - LR foi ≈ 8 min.

- Preparação das Amostras e Metodologia para pesquisa de Cilindrospermopsina

Relativamente à deteção e quantificação de Cilindrospermopsina, procedeu-se da mesma maneira que para a amostra de Microcistina, tendo desta feita, utilizado como solvente de extração água com Ácido Trifluoroacético (ATF a 0.1%).

As frações purificadas de cilindropermopsina foram então quantificadas no Waters Alliance e2695 sistema de HPLC acoplado com um PDA 2998 numa coluna fase Atlantis® HILLIC (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm) da Waters a 40°C. A gama de PDA estava entre 210-400 nm com um comprimento de onda fixo de 262 nm. A eluição isocrática foi também uma solução de metanol a 5 % contendo 2 mM de sódio 1 - heptanosulfonato mono-hidratado (99 %) com um fluxo de 0.9 mL/min e um volume de injeção de 10 µl. O sistema foi calibrado usando um conjunto de sete diluições de padrão cilindropermopsina (25, 20, 10, 5, 2, 1 e 0.5 µg/ml) em água ultrapura. O tempo de retenção do pico cilindropermopsina foi de 7,35 min.

Cada vial foi injetado em duplicado e cada corrida de HPLC de dez amostras foi constituída com um branco e duas concentrações padrão diferentes. O software de dados *Empower 2 Chromatography* foi utilizado para o cálculo e divulgação das informações do pico.

Todos os solventes de HPLC foram filtrados (Pall GH Polypro 47 mm, 0.2 µm) e desgaseificados por banho de ultrassons.

3.6 – Ensaio enzimáticos ELISA para deteção de Microcistinas

Este ensaio foi realizado apenas para as amostras liofilizadas, tendo estas sofrido a mesma preparação descrita para o HPLC, utilizando como solvente de extração o Metanol (80%).

Foram sonicadas, na potência máxima (60 Hz) durante 1 minuto (em gelo), utilizando uma sonda de ultrassons. Após a evaporação no SpeedVac, os extratos existentes foram dissolvidos em 1 ml de água ultra-pura esterilizada tendo, posteriormente, sido filtrados através de Millex 0.45 µm. Foram feitas diluições de 1:10 e 1:100 de cada uma das amostras já filtradas.

Até à realização dos testes de ELISA as alíquotas foram acondicionadas no congelador a -20°C.

Foi utilizado o kit de ELISA referente à deteção e quantificação das Microcistinas e Nodularinas (Microcystins-ADDA ELISA, Microtiter Plate, Abraxis). A preparação das amostras foi executada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit.

Para se proceder à leitura dos resultados, recorreu-se ao leitor de placas da BioTek (synergy HT) a 450 nm.

4- Resultados

4.1- Identificação das cianobactérias – Isolamento

Doze amostras de suplementos alimentares (quatro de Clorela e oito de Spirulina) de diferentes marcas foram adquiridas em Ervanárias do Grande Porto no mesmo período de tempo.

Em meio Z8 verificou-se o crescimento de cianobactérias em seis amostras (C1, C4, S1, S4, S5 e S6), enquanto que em meio Z8 com NaCl obteve-se em três amostras (S1, S5 e S6). (tabela IX)

Tabela IX – Crescimento de cianobactérias nas amostras liofilizadas em Meio Z8 e Meio Z8 com NaCl

Amostras	Crescimento em Meio Z8	Crescimento em Meio Z8 com NaCl
C1	+	-
C2	-	-
C3	-	-
C4	+	-
S1	+	+
S2	-	-
S3	-	-
S4	+	-
S5	+	+
S6	+	+
S7	-	-
S8	-	-

Legenda: + crescimento no meio; - ausência de crescimento no meio

Das nove amostras onde se verificou crescimento de cianobactérias, procedeu-se ao seu isolamento cujas características morfológicas (filamentosas e coloniais) foram verificadas através da observação em microscópio ótico e validadas posteriormente por sequenciação.

Em meio Z8 com NaCl observou-se a presença de cianobactérias filamentosas e coloniais. No meio Z8 cresceram cianobactérias filamentosas e coloniais. (tabelas X e XI)

Tabela X – Identificação Morfológica das Cianobactérias Isoladas em Meio Z8 com NaCl

Amostras	Tipo de Organização Celular	Código	Ordem	Gênero	Morfometria Celular ¹
S1	Filamentosa	S1F sal	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i>	2.2 x 1.6 ± 0.4 µm
S5	Filamentosa	S5F sal	Nostocales	<i>Nostoc</i>	4.9 x 3.8 ± 0.5 µm
S6	Colonial	S6C sal	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	Ø 4.3 ± 0.6 µm

¹ - Altura x largura (média ± DP, n= 20)

Legenda: C – Colonial; F - Filamentosa

Tabela XI – Identificação Morfológica das Cianobactérias Isoladas em Meio Z8

Amostras	Tipo de Organização Celular	Código	Ordem	Gênero	Morfometria Celular ¹
C1	Filamentosa	C1F	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i>	2.1 x 1.5 ± 0.3 µm
C1	Colonial	C1C	Chroococcales	<i>Chroococcus</i>	Ø 3.2 ± 0.5 µm
C4	Colonial	C4C	Chroococcales	<i>Chroococcus</i>	Ø 4.4 ± 0.4 µm
S1	Filamentosa	S1F	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i>	2.0 x 1.6 ± 0.3 µm
S1	Colonial	S1C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	Ø 3.3 ± 0.5 µm
S4	Colonial	S4C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	Ø 3.9 ± 0.4 µm
S5	Colonial	S5C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	Ø 3.6 ± 0.4 µm
S6	Filamentosa	S6F	Oscillatoriales	<i>Nodosilinea</i>	1.9 x 1.5 ± 0.2 µm
S6	Colonial	S6C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	Ø 3.4 ± 0.7 µm

¹ - Altura x largura (média ± DP, n= 20)

Legenda: C – Colonial; F - Filamentosa

Os isolados foram depositados na coleção de cultura do LEGE (LEGE CC). A correspondência entre os códigos dos isolados (tabela X e XI) e os novos códigos LEGE pode ser encontrada no Anexo I.

✧ Amostras Liofilizadas

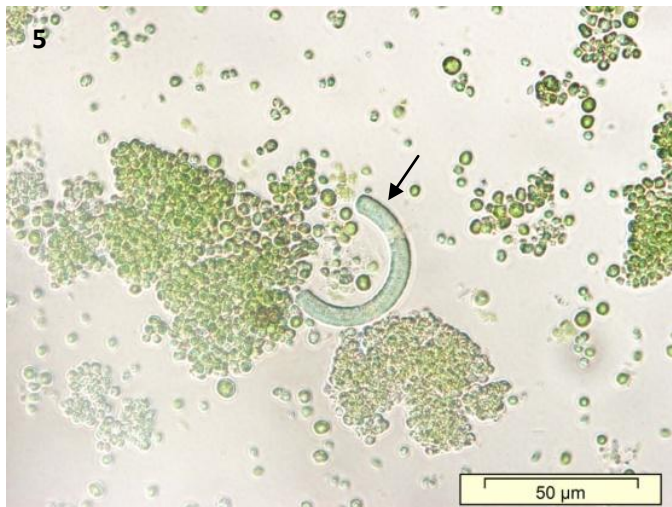


Fig. 5 – Amostra C1. Na figura observa-se Clorella e um fragmento de Spirulina.

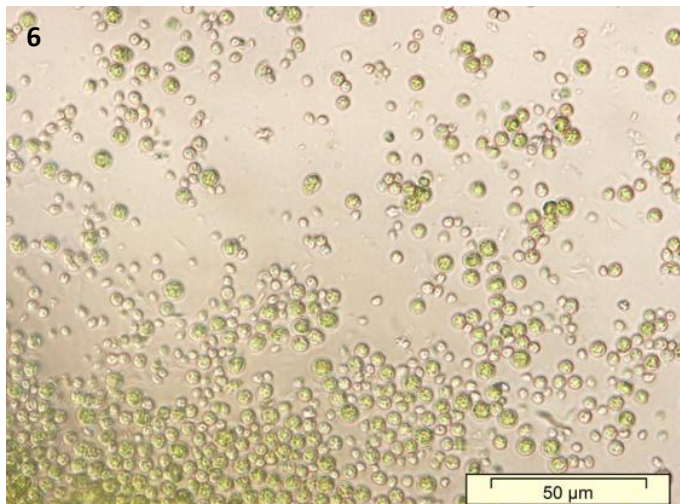


Fig. 6 – Amostra C2. Na figura observa-se Clorella.

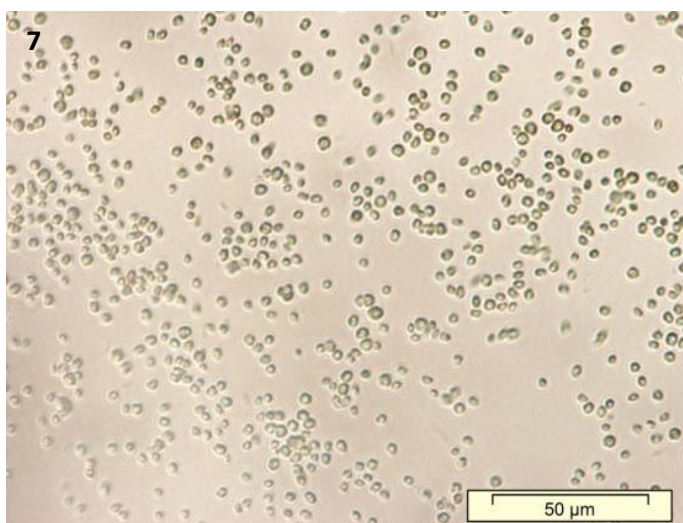


Fig. 7 – Amostra C3. Na figura observa-se Clorella.

Fig. 5 a 8 – Fotografias microscópicas de amostras liofilizadas de Clorella



Fig. 8 – Amostra C4. Na figura observa-se Clorella e um fragmento de Spirulina.

Fig. 9 a 17 – Fotografias microscópicas de amostras liofilizadas de Spirulina



Fig. 9 e Fig. 10 - Amostra S1. Na figura 9 observa-se Spirulina e uma Clorella; na figura 10 observa-se Spirulina e um fragmento que pertence à ordem Oscillatoriales.

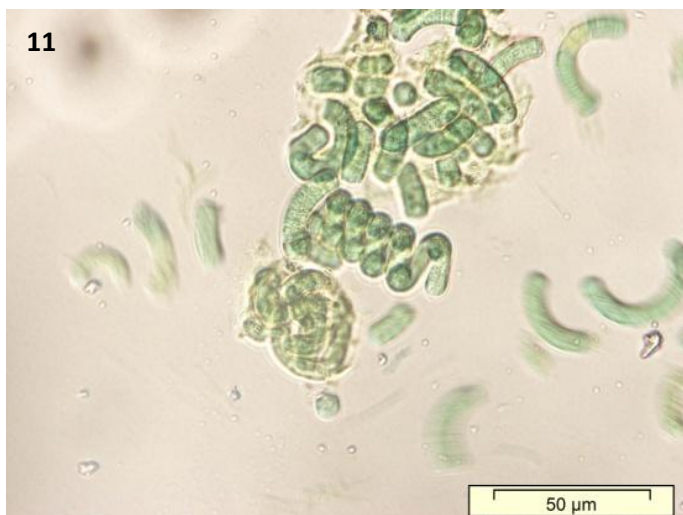


Fig. 11 – Amostra S2. Na figura observa-se Spirulina.



Fig. 12 – Amostra S3. Na figura observa-se Spirulina.

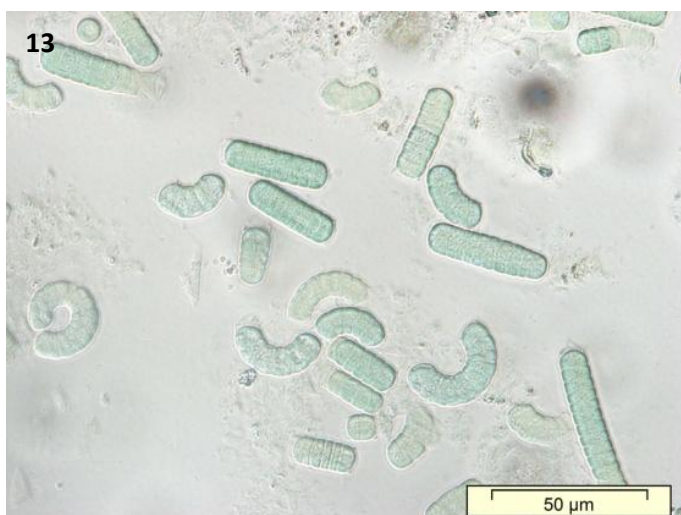


Fig. 13 – Amostra S4. Na figura observa-se Spirulina.

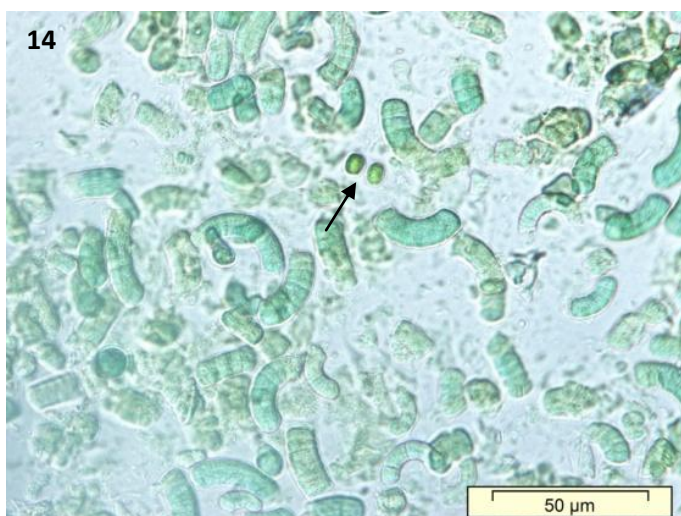


Fig. 14 – Amostra S5. Na figura observa-se Spirulina e duas Clorella



Fig. 15 – Amostra S6. Na figura observa-se Spirulina.

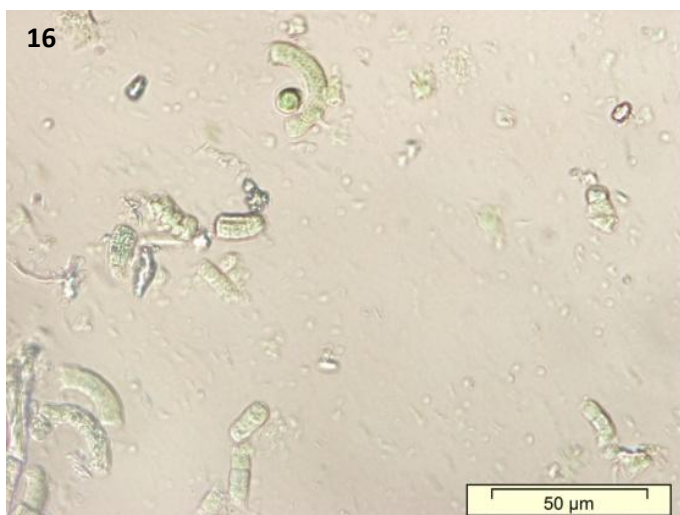


Fig. 16 - Amostra S7. Na figura observa-se Spirulina.

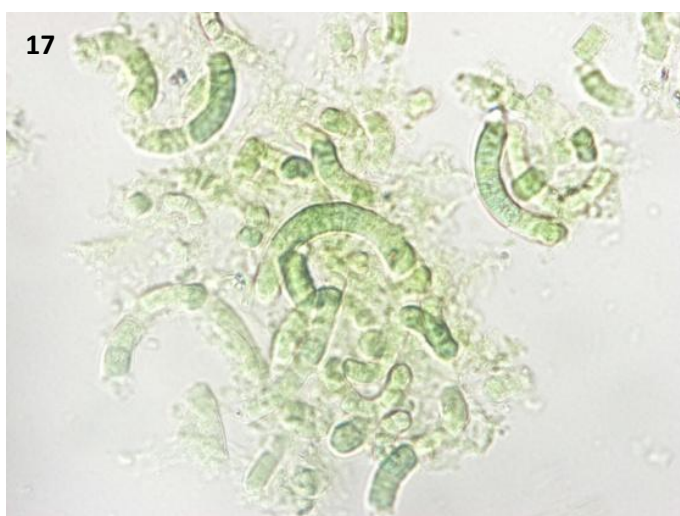


Fig. 17 – Amostra S8. Na figura observa-se Spirulina.

✧ Isolados

Fig. 18 a 20 – Fotografias microscópicas dos isolados em meio Z8 com NaCl.

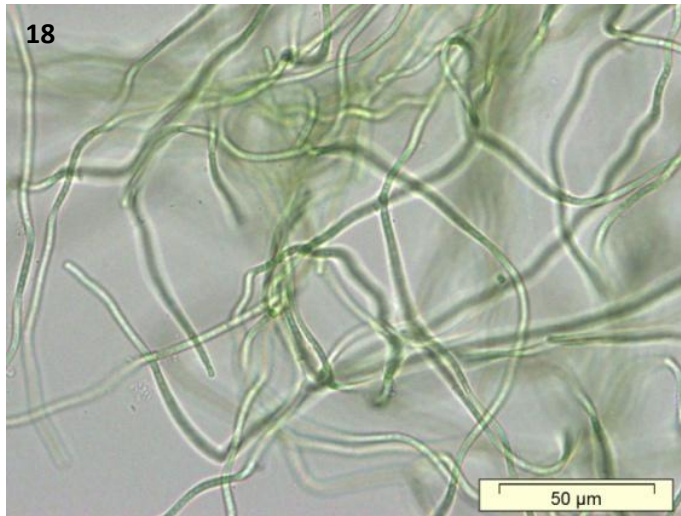


Fig. 18 – Amostra S1F. Na figura observa-se o género *Leptolyngbya*.

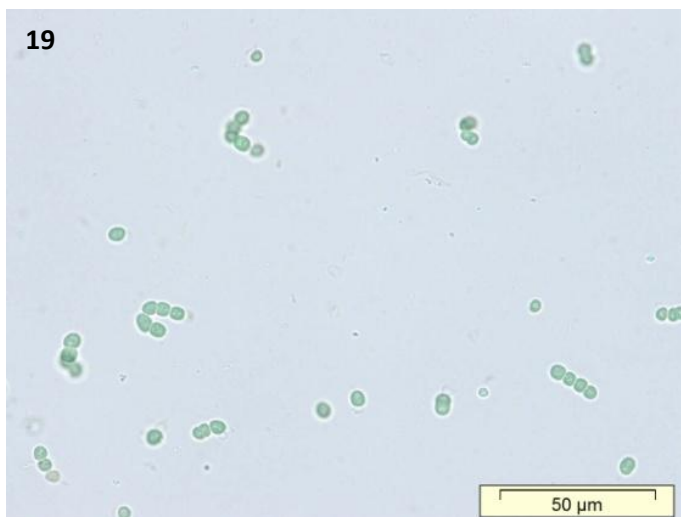


Fig. 19 – Amostra S5F. Na figura observa-se o género *Nostoc*.

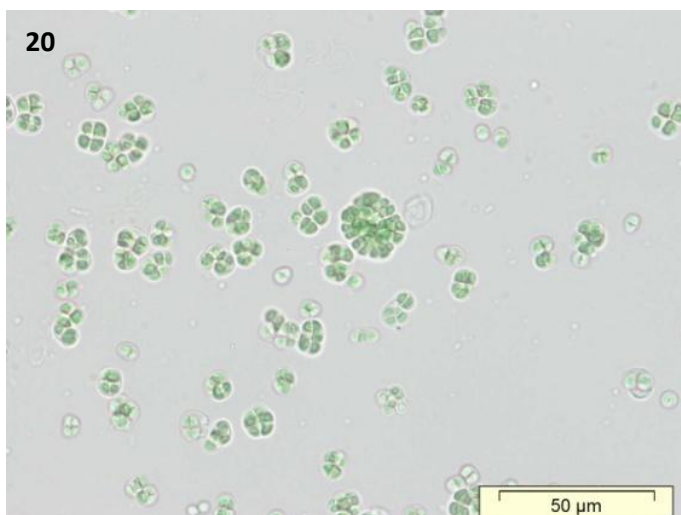


Fig. 20 – Amostra S6C. Na figura observa-se o género *Gloeocapsopsis*.

Fig. 21 a 30 – Fotografias microscópicas dos isolados em meio Z8.

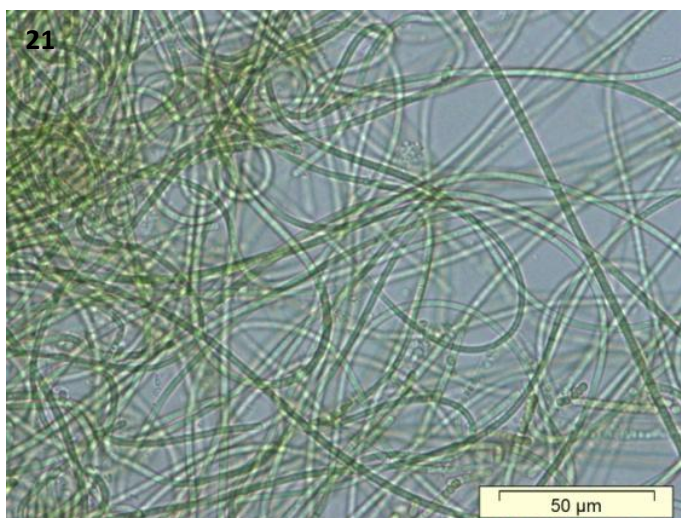


Fig. 21 – Amostra C1F. Na figura observa-se o género *Leptolyngbya*.

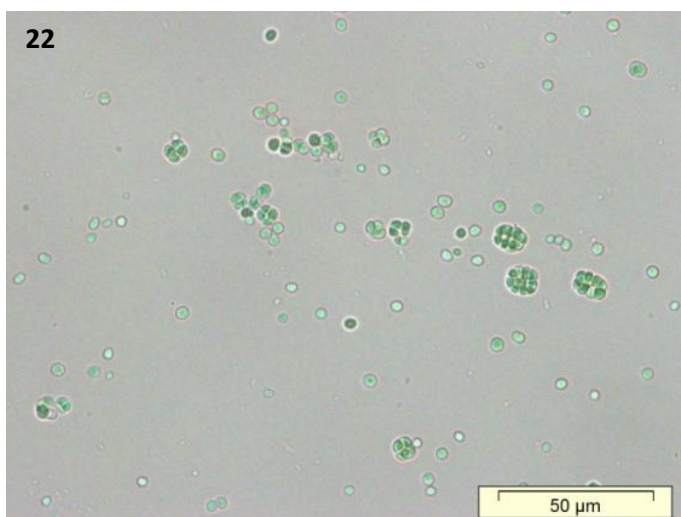


Fig. 22 – Amostra C1C. Na figura observa-se o género *Chroococcus*.

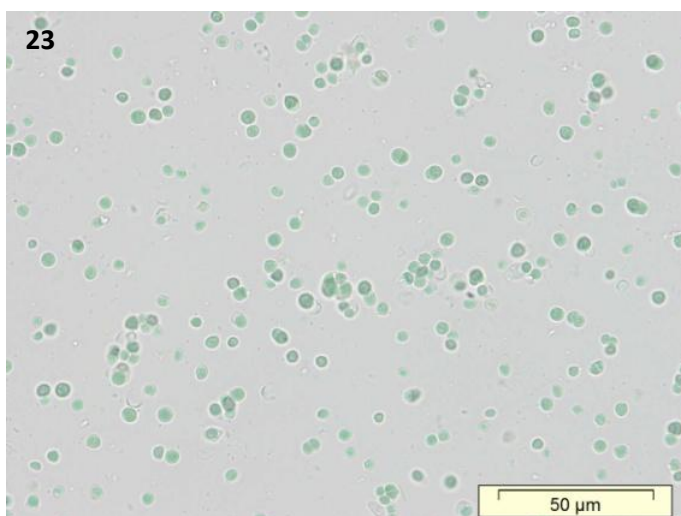


Fig. 23 – Amostra C4C. Na figura observa-se o género *Chroococcus*.

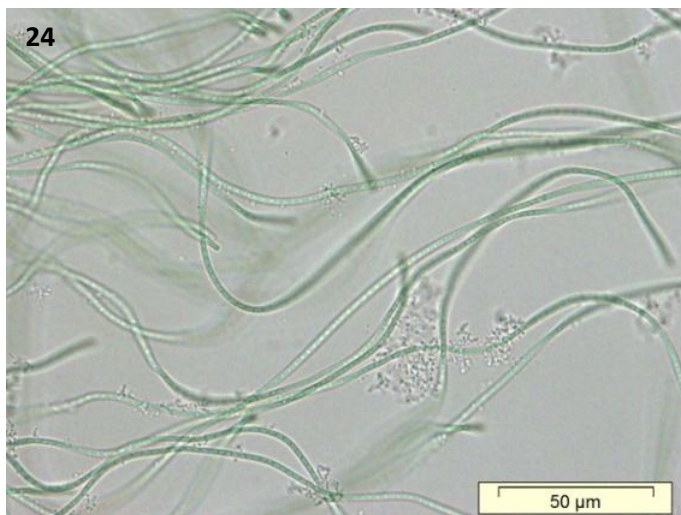


Fig. 24 – Amostra S1F. Na figura observa-se o género *Leptolyngbya*.

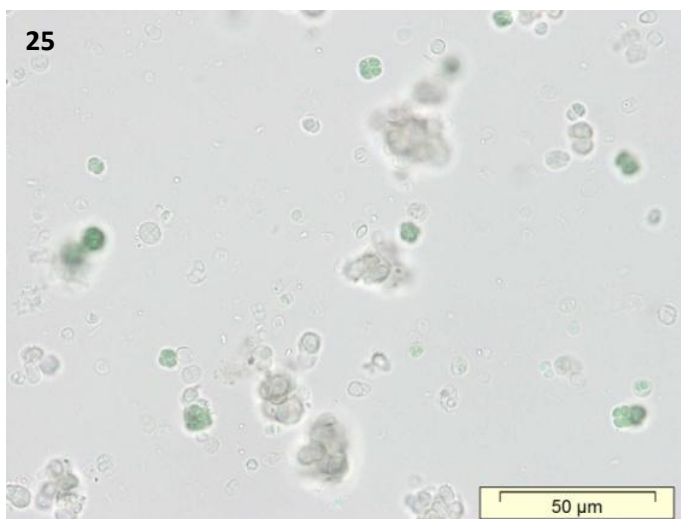


Fig. 25 – Amostra S1C. Na figura observa-se o género *Gloeocapsopsis*.

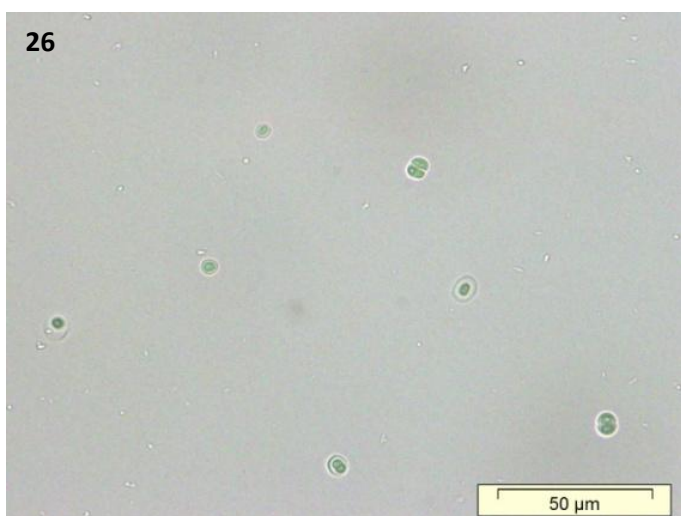


Fig. 26 – Amostra S4C. Na figura observa-se o género *Gloeocapsopsis*.

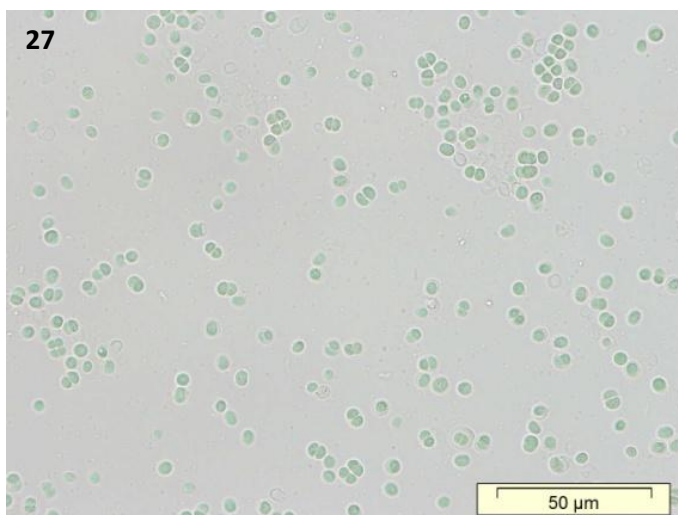


Fig. 27 – Amostra S5C. Na figura observa-se o género *Gloeocapsopsis*.

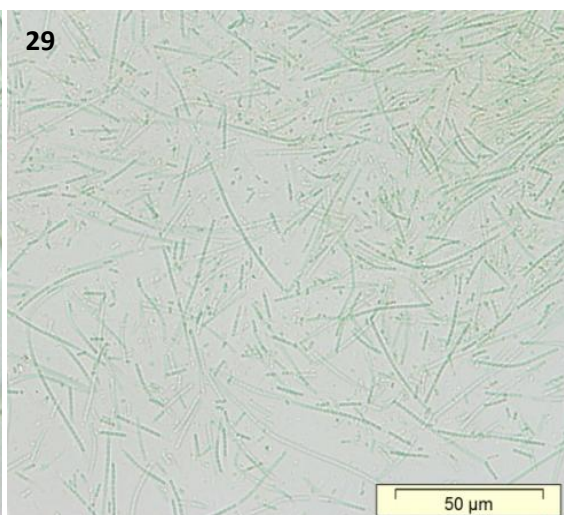


Fig. 28 e Fig. 29 – Amostra S6F. Na figura observa-se o género *Nodosilinea*.

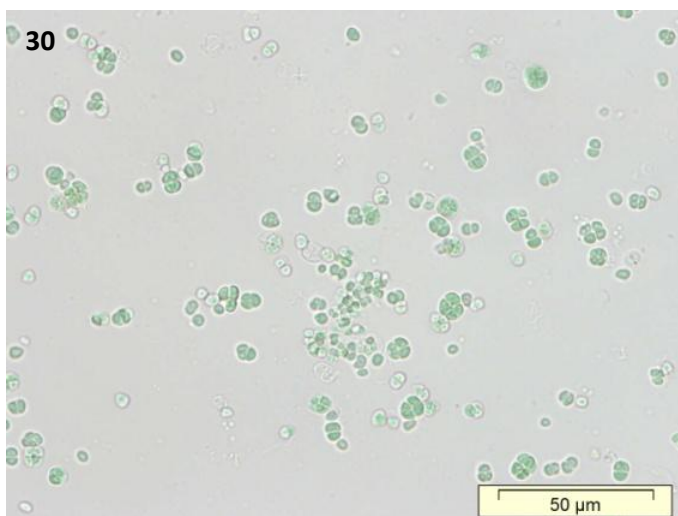


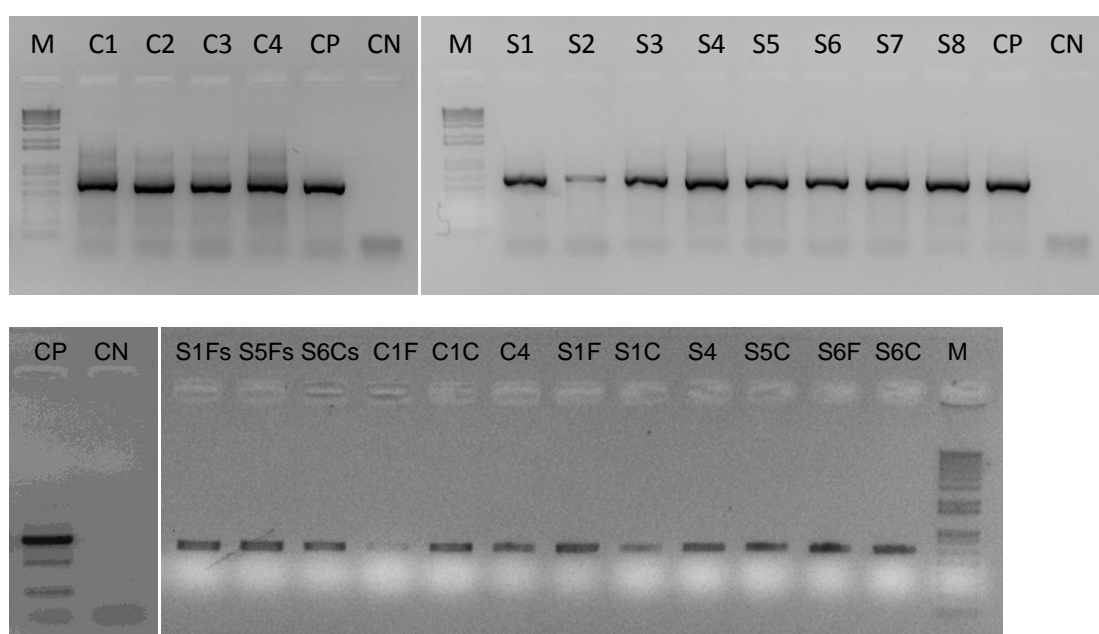
Fig. 30 – Amostra S6C. Na figura observa-se o género *Gloeocapsopsis*.

4.2- Resultados da análise molecular

4.2.1 – Resultados obtidos por PCR

Reações simples e *multiplex* foram realizadas para testar os *primers* reconstituídos e para verificar a eficácia dos protocolos na amplificação dos genes alvo.

A maioria dos produtos destas reações demonstrou eficácia, não tendo havido problemas na amplificação com o uso dos *primers* como exemplificado na figura 31 (gene *16S rRNA*), estando os restantes resultados de PCR's no Anexo II.



Legenda: CP – Controlo Positivo; CN – Controlo Negativo

Fig. 31 – Amplificação do gene *16S rRNA* nas amostras liofilizadas e isolados

Como verificado na figura 31, comprovou-se que o gene codificante *16S rRNA* estava presente em todas as amostras liofilizadas e nos isolados.

Tendo-se obtido este resultado, foi realizada uma nova amplificação desses genes específicos para o dobro do volume de forma a se proceder à identificação dos géneros/espécies através da sequenciação. (tabelas XV, XVI e XVII)

De todas as amostras analisadas apenas duas (C2 e C3) apresentaram ser negativas para todos os genes específicos de cianotoxinas pesquisadas (tabelas XII e XIII).

Tabela XII – Resultados dos PCR's das toxinas Microcistina e Nodularina e para detecção de *Microcystis* spp.

Amostra	<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyC</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>	<i>rpoC1</i>	<i>gyrB</i>
C1	-	-	-	-	-	-	-	(+)
C2	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	+	+	+	+	-	-	+
S4	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	+
S8	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + presença de banda (bp) no gene específico para a identificação da espécie; - ausência de banda (bp) no respectivo gene; (+) possível presença de banda (bp) no respectivo gene

Como demonstrado na tabela XII, a amostra S3 foi positiva relativamente aos genes específicos para microcistina todos estão presentes exceto *mcyG* e *rpoC1*.

Tabela XIII – Resultados dos PCR's das toxinas Cilindrospermopsina, Saxitoxina e Anatoxina-a

Amostra	<i>PS</i>	<i>PKS</i>	<i>AMT</i>	<i>rpoC1</i>	<i>sxtI</i>	<i>anaC</i>
C1	-	(+)	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-
C4	-	(+)	-	-	-	-
S1	-	-	-	(+)	+	-
S2	-	-	-	-	+	-
S3	-	(+)	-	-	+	-
S4	-	(+)	-	(+)	+	-
S5	-	-	-	(+)	+	-
S6	-	-	-	(+)	+	-
S7	(+)	+	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	+	-

Legenda: + presença de banda (bp) no gene específico para a identificação da espécie; - ausência de banda (bp) no respectivo gene; (+) possível presença de banda (bp) no respectivo gene

A tabela XIII apresenta os restantes resultados dos PCR's relativamente aos genes das cianotoxinas testadas.

Como é possível verificar-se, uma das amostras (S7) foi positiva no gene *PS* e no gene *PKS*.

Para o gene *rpoC1* específico para *C. raciborskii*, quatro amostras (S1, S4, S5 e S6) apresentaram-se positivas com bandas ténues.

Relativamente à saxitoxina, sete amostras (S1, S2, S3, S4, S5, S6 e S8) mostraram-se positivas para o gene codificante *sxtI*.

Os genes codificantes para anatoxina-a não estiveram presentes em nenhuma das amostras testadas.

Os resultados de PCR relativamente à presença de algumas bactérias patogénicas, nomeadamente *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, estão apresentados na tabela XIV.

Tabela XIV – Resultados dos PCR's das amostras liofilizadas e isolados (à data)

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
C1	+	+	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	-
C4	+	-	+	-	+	-	-
S1	-	-	-	-	+	-	-
S2	-	+	-	-	+	-	-
S3	-	-	+	-	+	-	-
S4	-	-	+	-	+	-	-
S5	-	+	-	-	+	-	-
S6	-	+	-	-	+	-	-
S7	-	+	-	-	+	-	-
S8	-	-	-	-	+	-	-
C1F	-	-	-	-	-	-	-
C1C	-	-	-	-	-	-	-
S1sF	-	-	-	-	-	-	-
S1F	-	-	-	-	-	-	-
S1C	-	-	-	-	-	-	-
S5C	-	-	-	-	-	-	-
S6F	-	-	-	-	-	-	-
S6C	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Amplificação do fragmento do gene específico para a identificação da espécie bacteriana (+); Ausência de amplificação do fragmento no respetivo gene (-)

Não se verificou a presença de *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, contudo detetou-se a presença de *E. coli* em duas amostras (C1, C4), *Pseudomonas aeruginosa* em cinco (C1, S2, S5, S6 e S7), *Salmonella* spp. em três (C4, S3, S4) e nove amostras (C4, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8) foram positivas em *Enterococcus*.

4.2.2 – Sequenciação

Após a excisão e purificação das bandas para os respetivos fragmentos de genes específicos, estes foram enviados para sequenciação com o intuito de identificar o género/espécie da Clorela e Spirulina (tabelas XV e XVI).

Tabela XV – Resultados da pesquisa no GenBank das sequências obtidas para o gene *16S rRNA* nas amostras liofilizadas, segundo o algoritmo *BLASTn*

Amostras liofilizadas	Resultado do BLASTn	bp	Homologia (%)	Número Acesso
C1	Parachlorella kessleri SAG 211-11g, chloroplast	507	97	FJ968741.1
	Chlorella kessleri SAG 211-11g, chloroplast			X65099.1
	Chlorella kessleri, strain 211-11h, chloroplast			D11346.1
C4	Parachlorella kessleri SAG 211-11g, chloroplast	504	91	FJ968741.1
	Chlorella kessleri SAG 211-11g, chloroplast			X65099.1
	Chlorella kessleri strain 211-11h, chloroplast			D11346.1
S1	Arthrospira platensis BHN2	629	100	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S2	Arthrospira platensis BHN2	631	99	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S3	Arthrospira platensis BHN2	639	99	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S4	Uncultured Arthrospira sp. clone CyE-8	663	100	KC687148.1
	Uncultured Arthrospira sp. clone CyE-2.30		99	KC687146.1
	Arthrospira platensis BY			KC195869.1
S5	Arthrospira platensis BHN2	652	100	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S6	Arthrospira platensis BHN2	641	100	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S7	Arthrospira platensis BHN2	653	99	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1
S8	Arthrospira platensis BHN2	643	99	KC536648.1
	Arthrospira platensis HF			KC195872.1
	Arthrospira platensis CG			KC195868.1

Tabela XVI – Resultados da pesquisa no GenBank das sequências obtidas para o gene *16S rRNA* nos isolados, utilizando o algoritmo *BLASTn*

Isolados	Resultado do BLASTn	bp	Homologia (%)	Número Acesso
C1F*	Leptolyngbya sp. CYN83 Leptolyngbya sp. CYN83 L.foveolarum	631	94	JF925321.1 JF925322.1 X84808.1
C1C	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	548	97 95	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1
C4C*	Chroococcidiopsis sp. CCMP2728 Chroococcidiopsis sp. PCC 7431 Chroococcidiopsis sp. PCC 8201	636	100 99	JF810075.1 AB074506.1 JF810081.1
S1 sal*	Leptolyngbya sp. Greenland_7 Filamentous thermophilic cyanobacterium tBTRCCn 407 Oscillatoriales cyanobacterium JSC-1	630	95 94	DQ431002.1 DQ471447.1 FJ788926.1
S1F*	Leptolyngbya sp. CYN83 Leptolyngbya sp. CYN83 L.foveolarum	623	96	JF925321.1 JF925322.1 X84808.1
S1C	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	629	98	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1
S4C	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	637	99 98	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1
S5 sal*	Anabaena sp. BHUAR002 Anabaena sp. BHUAR001 Cylindrospermum sp. A1345 Nostoc sp. CYN73 Nostoc sp. CYN85	571	97	HM235817.1 HM235816.1 DQ897365.1 JF925315.1 JF925316.1
S5C	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	633	99 98	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1
S6 sal	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	631	98	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1

S6F	Nodosilinea sp. CENA523 Nodosilinea sp. CENA522 Nodosilinea sp. CENA512	630	99	KF246490.1 KF246489.1 KF246481.1
S6C	Chroococcales cyanobacterium LEGE 06123 Gloeocapsa sp. PCC 7428 Gloeocapsa sp. PCC 7428	637	98	FJ589716.1 NR_102460.1 CP003646.1

*- foram excluídas as *uncultured sample sequences*

Com gênero/espécie devidamente identificados, procedeu-se à pesquisa de diversos genes específicos de cianotoxinas (tabela XVII) e bactérias patogênicas (tabela XVIII).

Tabela XVII – Resultados da pesquisa no GenBank das sequências obtidas para os genes específicos das cianotoxinas nas amostras liofilizadas, utilizando o algoritmo *BLASTn*

Amostras liofilizadas	Resultado do BLASTn	bp	Homologia (%)	Número Acesso
S3	Microcystis sp. RST 9501 peptide synthetase (mcyA) gene Microcystis aeruginosa PCC 7806 genome sequencing data, contig C322 Microcystis aeruginosa PCC 7806	261	100	JQ771630.1 AM778952.1 AF183408.1
S3	Microcystis aeruginosa PCC 7806 genome sequencing data, contig C322 Microcystis aeruginosa PCC 7806 Microcystis sp. Kot12/08-3 microcystin synthetase (mcyE) gene	444	99	AM778952.1 AF183408.1 KF219501.1
S7	Spirulina platensis gyrB gene for DNA gyrase B subunit	403	100	AB074765.1

Tabela XVIII – Resultados da pesquisa no GenBank das sequências obtidas para os genes específicos das bactérias patogênicas nas amostras liofilizadas, utilizando o algoritmo *BLASTn*

Amostras liofilizadas	Resultado do BLASTn	bp	Homologia (%)	Número Acesso
C1	Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 Escherichia coli LY180 Escherichia coli APEC O78	654	99	U00096.3 CP006584.1 CP004009.1
C4	Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 Escherichia coli LY180 Escherichia coli APEC O78	264	100	U00096.3 CP006584.1 CP004009.1

As sequências amplificadas obtidas através dos diversos genes específicos estão registadas no Anexo III.

4.3 – Resultados obtidos por HPLC

Tentou-se detetar a microcistina na amostra S3 e a cilindrospermopsina na amostra S7 por HPLC, tendo obtido resultado negativo em ambas. (Anexo IV)

4.4 – Resultados obtidos por ELISA

As amostras liofilizadas foram analisadas por ELISA, detetando-se a presença de microcistina em todas elas. (tabela XIX e figura 32)

Tabela XIX – Resultados da Microcistina obtidos por ELISA, nas amostras liofilizadas

Amostras	µg/L	µg	Peso utilizado (g)	Peso médio/comp (g)	Através Biomassa Total MC µg/comp	Mínimo Consumível µg MC/1 comp	Média µg MC/3 comp	Máximo Consumível µg MC/6 comp
C1	11	0,011	0,1195	0,590	0,054	0,054	0,163	0,326
C2	41,2	0,0412	0,1084	0,563	0,214	0,214	0,642	1,284
C3	4,3	0,0043	0,1062	0,383	0,016	0,016	0,047	0,093
C4	68,1	0,0681	0,1053	0,499	0,323	0,323	0,968	1,936
S1	43,2	0,0432	0,1029	0,640	0,269	0,269	0,806	1,611
S2	15,4	0,0154	0,1014	0,521	0,079	0,079	0,237	0,475
S3	46,7	0,0467	0,1017	0,924	0,424	0,424	1,273	2,547
S4	20,9	0,0209	0,1012	0,302	0,062	0,062	0,187	0,374
S5	5,5	0,0055	0,1015	0,402	0,022	0,022	0,065	0,131
S6	6,1	0,0061	0,1043	0,444	0,026	0,026	0,078	0,156
S7	6,9	0,0069	0,1044	0,553	0,037	0,037	0,110	0,219
S8	8,2	0,0082	0,1029	0,344	0,027	0,027	0,082	0,164

Legenda: comp – comprimidos;

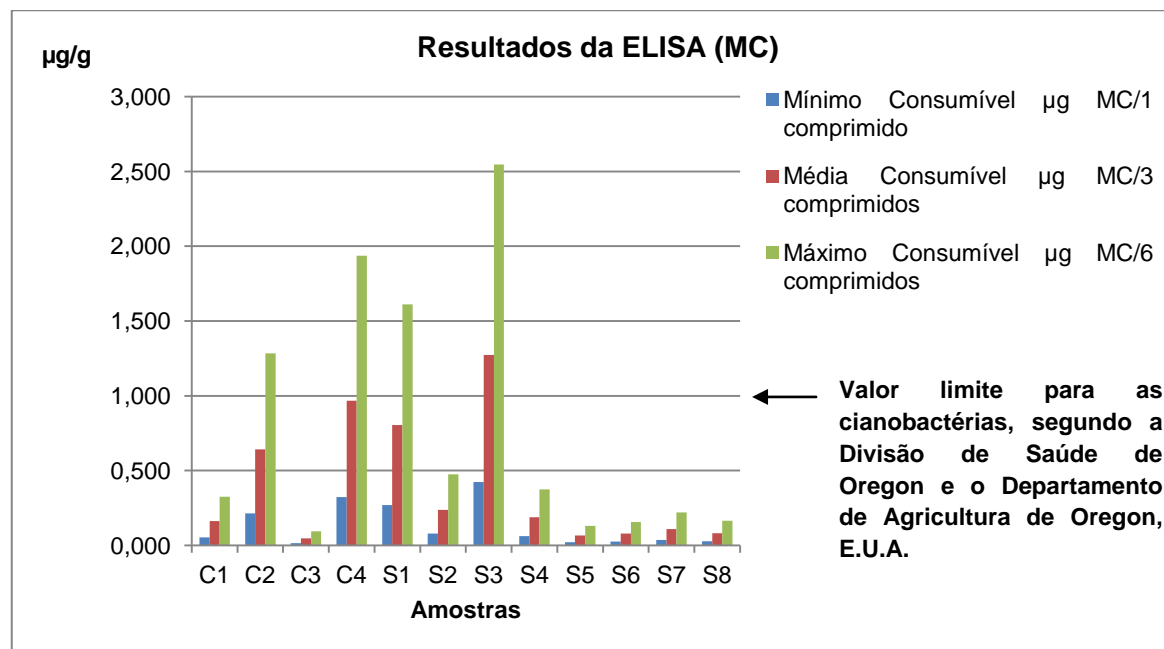


Fig. 32 - Resultado da Microcistina obtido por ELISA nas amostras liofilizadas, utilizando o mínimo, a média e o máximo de concentração ingerida/dia

5- Discussão de Resultados

Atualmente, os suplementos alimentares constituídos por microalgas são muito consumidos pela população e o seu processo de obtenção é essencialmente internacional.

Devido ao crescimento das microalgas e a sua colheita serem efetuadas a céu aberto, sem grande controlo de segurança alimentar, estas podem ser facilmente contaminadas e sofrer alterações microbiológicas. Esta má conduta permite, frequentemente, que estes suplementos se tornem veículos de transmissão de microrganismos e consecutivamente promovam surtos de intoxicação e infeções.

Devido à falta de controlo das medidas preventivas face à contaminação dos suplementos alimentares, a monitorização destes produtos revela-se essencial.

Doze amostras de suplementos alimentares com origem em microalgas (quatro de *Clorela* e oito da *Spirulina*), foram adquiridas nas Ervanárias no Grande Porto.

As amostras liofilizadas foram visualizadas ao microscópio ótico e duas das amostras de *Clorela* (C1 e C4) possuíam fragmentos de *Spirulina*. Nas amostras de *Spirulina* (S1 e S5) detetou-se a presença de *Clorela* e um fragmento na S1 que pertencia possivelmente à ordem *Oscillatoriales*.

A causa de contaminação poderá ter sido devido às condições de limpeza dos tanques de crescimento destas algas, ou à sua indevida manipulação e armazenamento. Tais contaminações poderão causar a produção indesejada de cianotoxinas, levando possivelmente a intoxicações/infeções por parte dos consumidores.

O isolamento dos organismos em culturas puras permite posteriormente identificar os géneros/espécies bem como a possível toxicidade, detetando e quantificando as concentrações das toxinas.

Neste trabalho, utilizaram-se os meios Z8 e Z8 com NaCl no sentido de isolar os organismos presentes nas amostras liofilizadas.

O crescimento dos organismos decorreu entre 1 a 4 meses mas tal acontecimento não ocorreu em todos os meios. Este processo de isolamento demorou mais três meses até à obtenção de isolados unialgais. A purificação e a cultura destes organismos algais pode ser difícil e morosa, sendo mais facilmente cultivadas quando acompanhadas por bactérias heterotróficas (Regueiras A., 2009).

Através dos meios Z8 e Z8 com NaCl foi possível obter o crescimento de isolados coloniais e filamentosos. Em meio Z8 com NaCl observaram-se a presença de dois organismos filamentosos e um colonial. No meio Z8 cresceram três organismos filamentosos e seis coloniais.

Verificou-se maior crescimento no meio Z8 do que no meio Z8 com NaCl e isto deve-se provavelmente ao fato das algas crescerem com mais intensidade em ambientes não halofílicos.

Com base no código de nomenclatura botânica, todos os organismos isolados foram diferenciados em gênero através da análise morfológica por microscópio ótico.

Como a identificação morfológica é uma análise subjetiva e por isso, passível de falhas, foi utilizado a análise molecular por PCR com amplificação e posterior sequenciação do gene *16S rRNA* específico para a classificação das cianobactérias (identificação polifásica).

Foi utilizada a identificação morfológica ao microscópio ótico nas amostras liofilizadas e foram identificados os gêneros e as espécies das cianobactérias presentes nessas amostras após amplificação e posterior sequenciação dos genes específicos; os isolados foram também identificados por análise morfológica e molecular.

O gene específico *16S rRNA* tanto codifica as cianobactérias quanto os cloroplastos presentes na *Clorella*.

Comprovou-se que o gene codificante *16S rRNA* estava presente em todas as amostras liofilizadas e nos isolados tanto nas amostras de *Spirulina* como na *Clorella*.

Deste modo, os resultados da sequenciação referentes aos isolados estiveram em concordância com as identificações morfológicas ao microscópio ótico. O fato de estar presente o gene *16S rRNA* na *Chorella* significa que se detetou não uma cianobactéria, mas sim os cloroplastos constituintes da alga em causa.

De todas as amostras analisadas apenas duas (C2 e C3) se apresentaram negativas para todos os genes específicos de cianotoxinas e bactérias patogênicas pesquisadas.

Os resultados obtidos relativos à identificação do gênero/espécie das cianobactérias nos suplementos alimentares que referiam conter unicamente *Spirulina* demonstraram não estarem em concordância com o conteúdo, pois o único gênero detetado foi o *Arthrospira platensis*, apesar das amostras S3, S4 e S6 identificarem esse mesmo gênero; no entanto, o produtor da amostra S8 identificou *Spirulina maxima* no seu produto.

Relativamente ao género *Chlorella*, apenas o produtor da amostra C4 referiu tratar-se de *Chlorella vulgaris*, não tendo no entanto sido esse o resultado encontrado após sequenciação.

Não é possível diferenciar microscopicamente as estirpes tóxicas das não tóxicas. Uma mesma espécie pode possuir estirpes diferentes que podem ser morfológicamente semelhantes mas diferir na produção de toxinas. A utilização de técnicas moleculares permitiu o desenvolvimento de métodos de identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas. Embora, geneticamente capazes de produzir toxina não significa que a toxina esteja a ser produzida (Regueiras A., 2009).

O uso de métodos moleculares para a identificação dos organismos e suas toxinas possibilita a sua rápida caracterização com baixo custo e sensibilidade de acordo com as sequências de ácidos nucleicos. Para além disso, estas técnicas não requerem o cultivo dos organismos em estudo.

Foram selecionados *primers* de genes envolvidos na produção de microcistina, nodularina, cilindrospermopsina, saxitoxina e anatoxina.

Foi utilizado um *primer* como alvo para aminotransferase localizado nos genes *mcyE* e *nda F* (microcistina e nodularina sintetases, respetivamente). Os *primers* *HEPF/HEPR* das cianobactérias hepatotóxicas amplificam um fragmento de 472 bp ao qual se denominou HEP (Jungblut e Neilan, 2006).

Só foi possível analisar as amostras liofilizadas para a deteção de cianotoxinas, no entanto, os isolados deveriam ter sido testados, mas não foi possível tal realização devido à falta de tempo.

Apesar de terem ocorrido amplificações nos PCR's com os genes específicos nomeadamente *PS*, *PKS*, *rpoC1* e *sxtI*, não foi possível obter resultados da sequenciação devido à sua má qualidade.

A amostra S7 foi positiva no gene *gyrB*, que é um gene específico para *M. aeruginosa*, no entanto, constatou-se após sequenciação que amplificou para *Spirulina platensis*, como tal, podemos dizer que estamos perante um falso positivo.

Na amostra S3 não se pode identificar a existência da *M. aeruginosa*, apesar de ter havido uma sequenciação correta dos genes *mcyA* e *mcyE* que tiveram uma similaridade de 100 e 99%, respetivamente. Uma vez que o gene *rpoC1* (específico para *Microcystis* spp.) foi negativo, não se pode aferir com toda a certeza que será *Microcystis* spp., para corroborar a sua existência seria necessário obter a sequência correta do gene

gyrB e utilizar o par de *primers* Micr184F/431R que amplifica uma região de 220 bp do gene *16S rRNA*, específica do género *Microcystis* (Neilan *et al.*, 1997).

As amostras positivas para o fragmento do gene *mcyA* indicam elevada probabilidade de produzir microcistina (Hisbergues *et al.*, 2003). Estirpes de cianobactérias produtoras de microcistina possuem um *cluster* de genes de microcistina sintetase (*mcy*) crucial para a produção da toxina. Quando esse *cluster* não está presente ou contém uma cópia incompleta, geralmente as estirpes não são produtoras da toxina (Regueiras A., 2009).

O *mcyG* foi o único gene de *mcy* que se apresentou negativo na amostra S3. É possível que este resultado seja um falso negativo ou então o *cluster* está incompleto e como tal não produz a toxina.

Assim, confirma-se a necessidade e a importância de se pesquisar vários genes do *cluster mcy* para inferir sobre a possível presença da toxina.

Para comprovar a deteção/quantificação de microcistinas e cilindrospermopsina utilizou-se o método de HPLC mas os resultados em ambos apresentaram-se negativos. Este fato deveu-se possivelmente à reduzida quantidade destas toxinas nas amostras ou à sua não produção nas mesmas.

Comparando os resultados obtidos das cianobactérias entre o PCR e as técnicas de HPLC, a análise molecular mostrou ser mais sensível uma vez que, embora não quantificável, foi possível determinar a presença dos genes de microcistina.

Num estudo realizado por Saker e seus colaboradores (2007) na deteção de cianobactérias toxigénicas nos suplementos alimentares, foi igualmente comprovada a utilização eficaz dos métodos moleculares para detetar a presença de microcistina nestes produtos consumíveis. Estes autores concluíram que a técnica de PCR é um método rápido, relativamente barato e altamente sensível na identificação de géneros/espécies produtoras destas toxinas.

O método de HPLC utiliza os padrões da toxina, mas apenas existem para um pequeno número de isoformas. O elevado custo e os reduzidos volumes que são comercializados, também são outros inconvenientes desta técnica (Regueiras A., 2009).

Deste modo, procedeu-se à quantificação das microcistinas por ELISA que providência uma estimativa da quantidade desta toxina com um processamento simples e rápido da amostra. A quantificação por ELISA está dependente da capacidade dos anticorpos reconhecerem as variantes da microcistina existentes na amostra, apesar de

que, nem todas as toxinas possuem a mesma afinidade para os anticorpos (Regueiras A., 2009).

A técnica ELISA foi aplicada com sucesso pois permitiu comprovar e quantificar a microcistina na amostra S3. O fato de se ter detectado e quantificado a microcistina na ELISA e não em HPLC deve-se aos limites de detecção desta toxina por HPLC ser 1000 vezes superior ao da ELISA (Regueiras A., 2009).

O ELISA demonstra maior qualidade nos resultados em relação ao HPLC, porque é mais sensível e por conseguinte fornece mais confiança nos seus valores.

Para fazer prova face a estes resultados, o uso do método de LC-MS na quantificação desta toxina na amostra S3 mostrar-se-ia eficaz, pois esta técnica é mais sensível. Contudo, não foi possível a sua realização por falta de tempo.

Estudos previamente efetuados referem que variações ocorridas em parâmetros como a luz, temperatura, pH e nutrientes podem influenciar na produção de microcistina (WHO, 1999).

A Organização Mundial de Saúde, considera um limite de toxicidade por microcistinas em humanos devido ao risco de promoção de tumores e aos distúrbios gastrointestinais.

A legislação que define o limite máximo de microcistina em cianobactérias está vigente com o valor de 1 µg/g (Gilroy *et al.*, 2000). A quantificação de microcistinas é muito importante, uma vez que estas toxinas se tornam problemáticas e potencialmente tóxicas quando presentes em determinadas concentrações.

De acordo com os resultados obtidos por ELISA, os valores de microcistina nos suplementos alimentares apresentam-se, na sua maioria, com a concentração inferior à proibida por lei para as cianobactérias, de acordo com a Divisão de Saúde de Oregon e o Departamento de Agricultura de Oregon, E.U.A. (Gilroy *et al.*, 2000). Na indicação do produto, referente à amostra (S3) estas aconselham a que se tome quatro comprimidos por dia (o equivalente a 1,698 µg/g) ultrapassando, por isso, 1 µg/g.

Saker e seus colaboradores (2007), também verificaram a presença de microcistinas em suplementos alimentares produzidos para consumo humano.

Torna-se importante referir que todos os produtos alimentares adquiridos nas Ervanárias contêm indicação quanto à toma máxima diária dos comprimidos, porém esta toma varia entre 3 a 6 comprimidos/dia, tendo no entanto o produtor da C4 referido que a dose máxima diária varia entre 1 a 12 comprimidos. Este fato pode levar o consumidor a exagerar na dose diária da toma destes produtos e caso existam pequenas

concentrações de alguma toxina nos comprimidos, poderá acarretar sérios problemas para a saúde do indivíduo.

Relativamente às cianotoxinas presentes em suplementos alimentares constituídos por algas, ainda não existe legislação Europeia para padronizar os valores limite (Bruno M., 2005).

A deteção das bactérias patogénicas nos suplementos alimentares é importante uma vez que estes microrganismos em baixas concentrações podem provocar intoxicações alimentares e por sua vez levar à morte do indivíduo.

Neste trabalho laboratorial, foi identificada a *E. coli* através da sequenciação na amostra C1 e C4 com o gene *GADAB*, mas apesar de ter ocorrido amplificação para os organismos alvos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *Enterococcus*, a sequenciação foi inconclusiva.

Os resultados inconclusivos poderão dever-se à má qualidade da sequenciação, à presença de falsos positivos ou inespecificidade da reação.

6- Conclusão

Nos suplementos alimentares de *Clorella* verificou-se a ocorrência de cianobactérias e *E. coli* e nos suplementos de *Spirulina* detetaram-se alguns genes codificadores da microcistina.

A observação morfológica das cianobactérias e posterior análise molecular, serviu como base para concluir que os suplementos alimentares indicados como sendo unicamente constituídos por *Spirulina* demonstraram não estarem em concordância, com a maioria dos suplementos, pois o único gênero detetado foi *Arthrospira platensis*.

Tendo em conta que as cianobactérias representam um sério problema para o consumo humano, maiores conhecimentos sobre a ocorrência desta espécie e as suas toxinas são importantes.

A análise por PCR e posterior sequenciação nas amostras, permitiu detetar *clusters* de genes envolvidos na produção de microcistina. A técnica imunológica (ELISA) serviu como forma de comprovar a presença e quantificação desta toxina.

Deste modo, para a quantificação da microcistina, o ELISA demonstrou ser mais adequado que a cromatografia (HPLC), uma vez que os limites desta última para a deteção desta toxina é 1000 vezes superior ao da ELISA.

Para a deteção de bactérias patogénicas, a amplificação por PCR dos genes específicos e posterior sequenciação demonstraram ser bastante úteis devido à rapidez e sensibilidade.

A deteção de cianobactérias e *E. coli* em suplementos alimentares de *Chlorella* spp. e a presença de genes codificadores de microcistina em suplementos de *Spirulina* spp. indica a necessidade inquestionável de monitorizar estes produtos como medidas preventivas com vista a assegurar a fiabilidade da segurança alimentar.

Esta dissertação demonstra a grande importância do uso de métodos moleculares para a monitorização dos suplementos alimentares constituídos por algas.

Visto que neste trabalho apenas foram detetados os genes codificadores de microcistina como potenciais causadores de intoxicações alimentares, em pesquisas posteriores seria interessante e extremamente importante a deteção/quantificação de outras cianotoxinas nestes produtos.

A análise de outros suplementos algais relativamente à presença de cianotoxinas e de bactérias patogénicas também poderá fornecer dados importantes para assegurar a saúde pública.

Proceder-se ao estudo de clones com o intuito de efetuar uma biblioteca de clones e DGGE também é um trabalho interessante a se realizar num futuro próximo.

Este trabalho remete para a importância do controlo das condições de produção, manipulação e armazenamento dos suplementos alimentares indispensável para assegurar a saúde dos consumidores.

7- Referências Bibliográficas

- Abd-El-Haleem D., Kheiralla Z.H., Zaki S., Rushdy A.A., Abd-El-Rahiem W., 2003. Multiplex-PCR and PCR-RFLP assays to monitor water quality against pathogenic bacteria. *Journal of Environ Monit* 5, 865-70.
- Abreu A., 2013. Mortes por intoxicação autopsiadas na Cova da Beira entre 2001 e 2012, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Medicina, Universidade da Beira Interior – Ciências da Saúde, 1-35.
- Adams M., Motarjemi Y., 2002. Segurança Básica dos Alimentos para Profissionais de Saúde, Organização Mundial de Saúde, 1-127.
- Alves C., Lima R.V., 2009. Dietary supplement use by adolescents, Artigo de Revisão – *Jornal de Pediatria (Rio Janeiro)*, 85(4), 287-294.
- Ambrosi M.A., Reinehr C.O., Bertolin T.E., Costa J.A.V., Colla L.M., 2008. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp., *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29(2), 109-117.
- Apeldoorn M.E. van, Egmond H.P. van, Speijers G.J.A., Bakker G.J.I., 2007. Toxins of Cyanobacteria, *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.
- Appelberg R., Silva N., 1998. Relação Parasita-Hospedeiro in *Microbiologia* volume 1, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 185-186.
- Baptista P., Venâncio A., 2003. Os Perigos Para a Segurança Alimentar no Processamento dos Alimentos, *Segurança Alimentar na Indústria Agro-Alimentar*, 1-109.
- Benbrook D., 2002. An ELISA method for detection of human antibodies to an immunotoxin, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 47, 169-175.
- Brito A., Ramos V., Seabra R., Santos A., Santos C.L., Lopo M., Ferreira S., Martins A., Mota R., Frazão B., Martins R., Vasconcelos V., Tamagnini P., 2012. Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. *Systematic na Applied Microbiology* 35, 110-119
- Bruno M., Fiori M., Mattei D., Melchiorre S., Messineo V., Volpi F., Bogialli S., Nazzari M., 2006. ELISA and LC-MS/MS methods for determining cyanobacterial toxins in blue-green algae food supplements, *Natural Product Research*, 20 (9), 827-834.
- Burtis C., Ashwood E., 1996. *Tietz - Fundamentos de Química Clínica*, 117.
- Chorus I., Bartram J., 1999. WHO - Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.

- Codd G.A., Morrison L.F., Metcalf J.S., 2004. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 264-272.
- Costa M., 2000. *Streptococcus* e Outros Cocos Gram Positivos Associados in *Microbiologia* volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 51-61.
- Cristino J., 2000. *Staphylococcus* in *Microbiologia* volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 39-44.
- Davis L., Kuehl M., Battey J., 1994. *Basic Methods in molecular biology*. Group PPBaP, editor Norwalk, CT: Appleton & Lange.
- Deng R., Chow T-J, 2010. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*, *Cardiovascular Therapeutics* 28(4), 33-45.
- Fergusson K.M., Saint C.P., 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18(2), 120-125.
- Fernandes C., 2011. Avaliação de Requisitos de Segurança Alimentar em Estabelecimentos de Ensino Público de um Concelho em Portugal, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar - Perfil Qualidade Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 1-114.
- Gilroy D.J., Kauffman K.W., Hall R.A., Huang X., Chu F.S., 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspect* 108(5), 435-9.
- Głowacka J., Szefel-Markowska M., Waleron M., Łojkowska E., Waleron K., 2011. Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies, *Acta Biochimica Polonica* 58(3), 321-333.
- Guia C. 2012. Hábitos de segurança alimentar na população estudantil do Instituto Politécnico de Beja, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária, 1-71.
- Haande S., 2008. On the Ecology, Toxicology, and Phylogeny of Cyanobacteria in Murchison Bay of Lake Victoria, Uganda, Dissertation presented for the degree of Doctor Scientiarum, Department of Biology Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Bergen, 1-68.
- Hisbergues M., Christiansen G., Rouhiainen L., Sivonen K., Börner T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180(6), 402-410.

Hitzfeld B.C., Hoyer S.J., Dietrich D.R., 2000. Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment, *Environmental Health Perspectives* 108(suppl 1), 113-122.

Jeske M., Trentini A.M., Bontempo M., 2011. Clorela, o alimento completo, *Compêndio de Fitoterapia, Manual da Medicina Integral*, 1-2.

Jorge R. (Instituto), 2006. Cinco Chaves Para Uma Alimentação Mais Segura, *Organização Mundial de Saúde*, 1-30.

Jungblut A.-D., Neilan B.A., 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 185(2), 107-114.

Karkos P.D., Leong S.C., Karkos C.D., Sivaji N., Assimakopoulos D.A., 2011. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications, *Review article - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-4.

Ke D., Picard F.J., Martineau F., Menard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of *enterococci*. *Journal Clin Microbiol* 37(11), 3497–3503.

Kellmann R., Mills T., Neilan B.A., 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *Journal of Molecular Evolution* 62, 267-280.

Kellmann R., Michali T.K., Neilan B.A., 2008. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. *Journal of Molecular Evolution* 67, 526-538.

Komárek J., Anagnostidis K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales, *Algological Stud.* 56, 247-345.

Komárek J., Anagnostidis K., 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. In: Ettl H., Gärner G., Heynig H., Mollenhauer D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548.

Komárek J., Anagnostidis K., 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil/2nd part: Oscillatoriales. In: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G., Schagerl M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759.

Kotai J., 1972. Instructions for the preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research, Blindern-11/69, Oslo*, 5.

- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R.E., 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry* 110, 782-786.
- Lopes V., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., Vasconcelos V., 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries, *Marine Environmental Research* 73, 7-16.
- Marcos J.Y., Soriano A.C., Salazar M.S., Moral C.H., Ramos S.S., Smeltzer M.S., Carrasco G.N., 1999. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *Journal Clin Microbiol* 37(3), 570–574.
- Molinero O., Márquez S., 2009. Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-related factors, *Nutrición Hospitalaria* 24(2),128-134.
- Neilan B., Jacobs D., Therese D., Blackall L., Hawkins P., Cox P., Goodman A., 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(3), 693-697.
- Neilan B., 2002. The Molecular Evolution and DNA Profiling of Toxic Cyanobacteria, *Current Issues Molecular Biology* 4, 1-11.
- Nonneman D., Zimba P.V., 2002. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology* 38(1), 230-233.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8), 3327-3332.
- Oliveira T., 2010. PCR em tempo real: métodos e aplicações, *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia, Universidade de Aveiro*, 1-111.
- Osswald J., 2002. Estudo da Toxicidade de Cianobactérias Diazotróficas da Albufeira do Maranhão, *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Hidrobiologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 1-89.
- Ouahid Y., Pérez-Silva G., del Campo F.F., 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology* 20(3), 235-242.
- Ouahid Y., del Campo F.F., 2009. Typing of toxinogenic *Microcystis* from environmental samples by multiplex PCR. *Applied Microbiology Biotechnology* 85, 405-412.
- Pearson L.A., Neilan B.A., 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 19(3), 281-288.

- Penha M.D., Baldassi L., Cortez A., Piatti R.M., Richtzenhain L.J., 2005. Detecção dos genes das toxinas alfa (α), beta (β) e épsilon (γ) em amostras de *Clostridium perfringens* isoladas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). *Arquivos do Instituto Biológico* 72(3), 277-281.
- Persson S., Olsen K.E., 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal Med Microbiol* 54, 1043–1047.
- Ramos M., 2000. Bactérias Anaeróbias in *Microbiologia* volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 227-256.
- Rantala-Ylinen A., Känä S., Wang H., Rouhiainen L., Wahlsten M., Rizzi E., Berg K., Gugger M., Sivonen K., 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and molecular methods to detect potencial producers. *Applied and Environmental Microbiology* 77(20), 7271-7278.
- Rasmussen J.P., Giglio S., Monis P.T., Campbell R.J., Saint C.P., 2008. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1503-1515.
- Regueiras A., 2009. Comparação de métodos de identificação e quantificação de cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio Tâmega), Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambientais, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, 1-127.
- Sá-Correia I., 2000. *Pseudomonadaceae* in *Microbiologia* volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 123-135.
- Santos P., 2011. Comportamento electroquímico das cianotoxinas Microcistina-LR e Nodularina e dos seus produtos de degradação, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Forense, Universidade de Coimbra, 1-102.
- Saker M., Welker M., Vasconcelos V., 2007. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption, *Applied Microbiol Biotechnology*, 73, 1136-1142.
- Schembri M.A., Neilan B.A., Saint C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16(5), 413-421.

Sergeira V., 2009. Controlo de Qualidade de Suplementos Alimentares Derivados de Plantas, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 1-120.

Silva C., 2006. Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia na Agricultura e no Ambiente, Universidade de São Paulo, 1-94.

Sivonen K., Jones G., 1999. Chapter 3 – Cyanobacterial Toxins, Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, WHO, 1-70.

Soares E., 2007. Doenças de Origem Alimentar – Infecções e Intoxicações. Segurança e Qualidade Alimentar, Ative (2), 6-8.

Sousa J., 2000. *Enterobacteriaceae* in Microbiologia volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 99-107.

Tanabe Y., Kasai F., Watanabe M., 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Microbiology 153, 3695-3703.

Taveira N., 2000. Detecção e Identificação Molecular de Microrganismos in Microbiologia volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 3-35.

Valério E., Chambel L., Paulino S., Faria N., Pereira P., Tenreiro R., 2009. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. Microbiology 155, 642-656.

Veloso M., 2000. *Campylobacter* e *Arcobacter* in Microbiologia volume 2, Ferreira W.F., Sousa J.C., Lidel, 137-143.

WHO, 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. In: Chorus I., Bartram J. (Eds), London and New York - World Health Organization.

Wilson KM, Schembri MA, Baker PD, Saint CP., 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. Applied and Environmental Microbiology 66(1), 332-338.

8- Anexos

Anexo I

Identificação Morfológica dos Isolados em Meio Z8 com NaCl

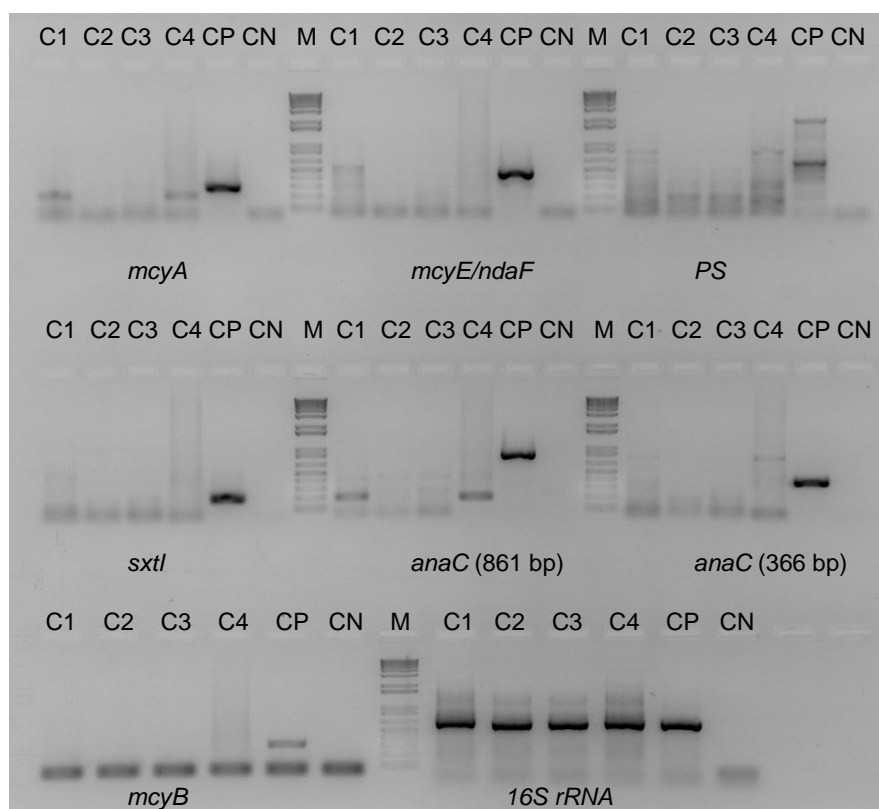
Código	Ordem	Género	Código LEGE
S1F sal	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> -like	13412
S5F sal	Nostocales	<i>Nostoc</i>	13413
S6C sal	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	13414

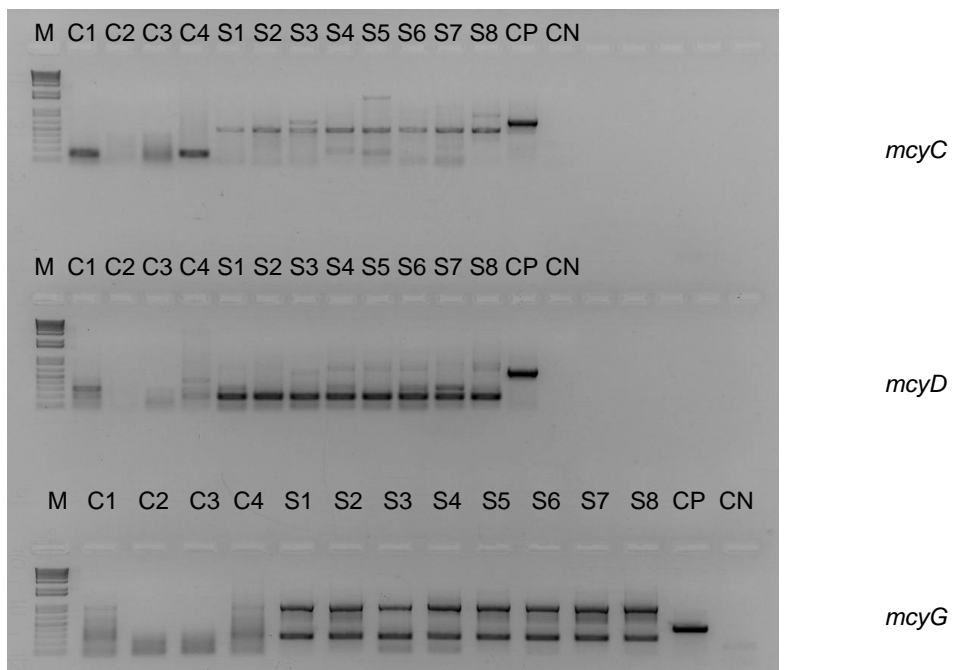
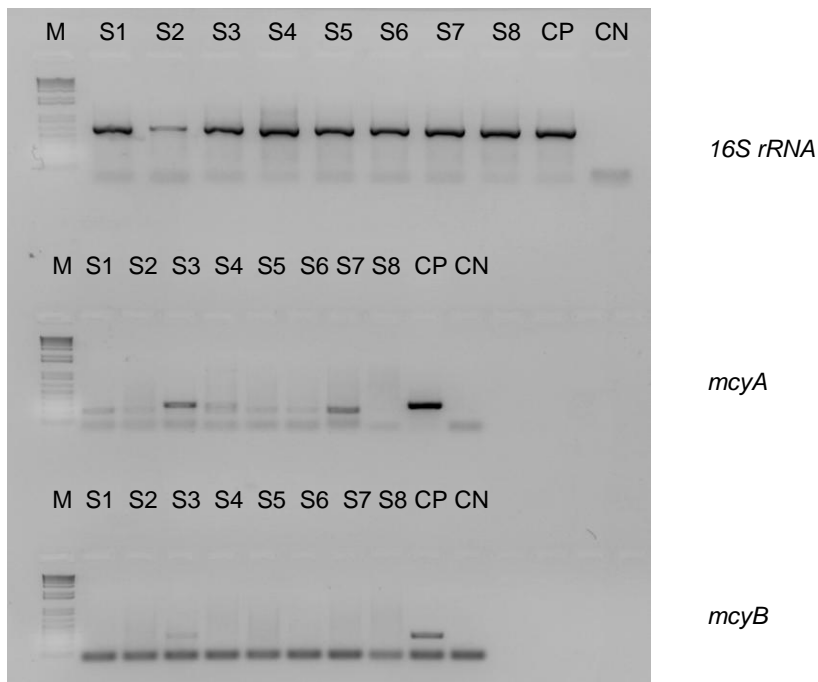
Identificação Morfológica dos Isolados em Meio Z8

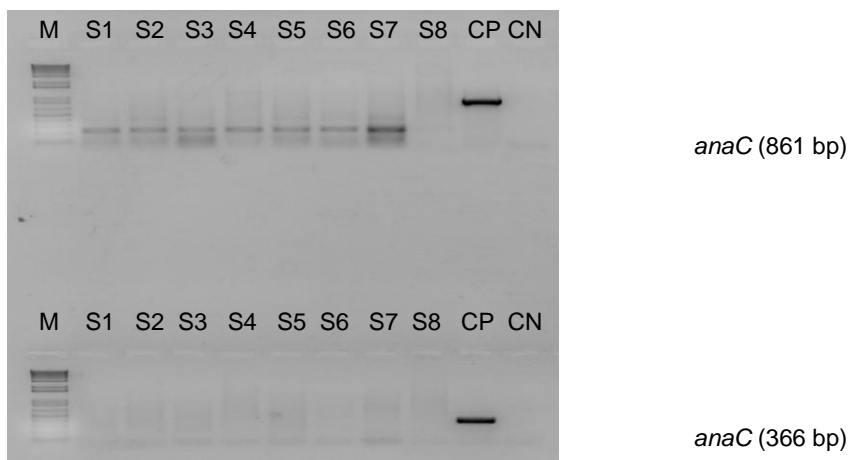
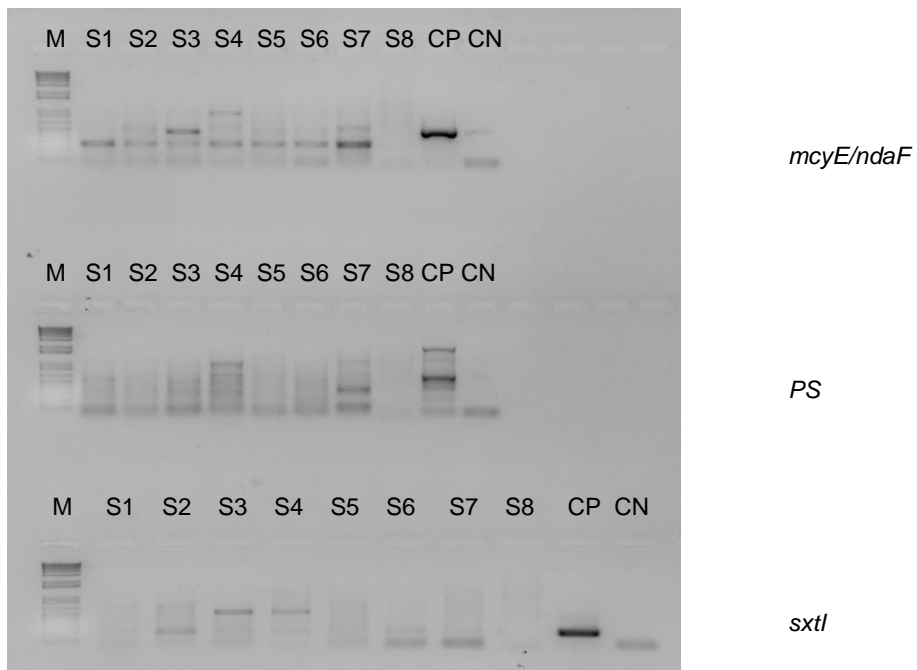
Código	Ordem	Género	Código LEGE
C1F	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> -like	13415
C1C	Chroococcales	<i>Chroococcus</i> -like	13416
C4C	Chroococcales	<i>Chroococcus</i> -like	13417
S1F	Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> -like	13418
S1C	Chroococcales	<i>Gloeocapsa</i> -like	13419
S4C	Chroococcales	<i>Gloeocapsa</i> -like	13420
S5C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	13421
S6F	Oscillatoriales	<i>Nodosilinea</i>	13422
S6C	Chroococcales	<i>Gloeocapsopsis</i>	13423

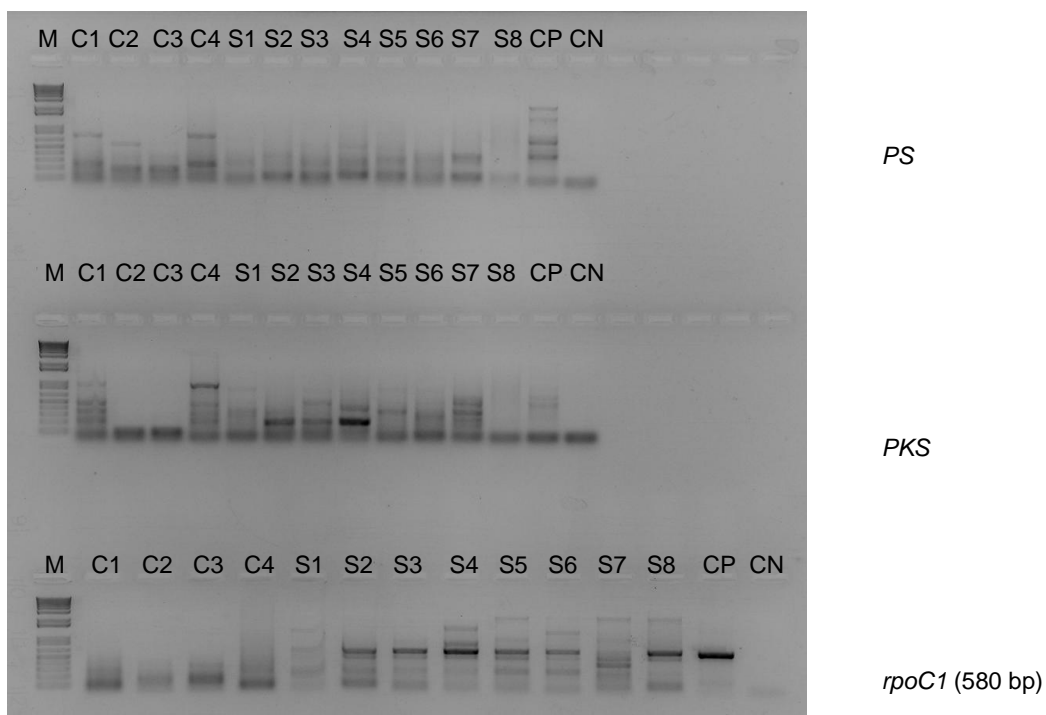
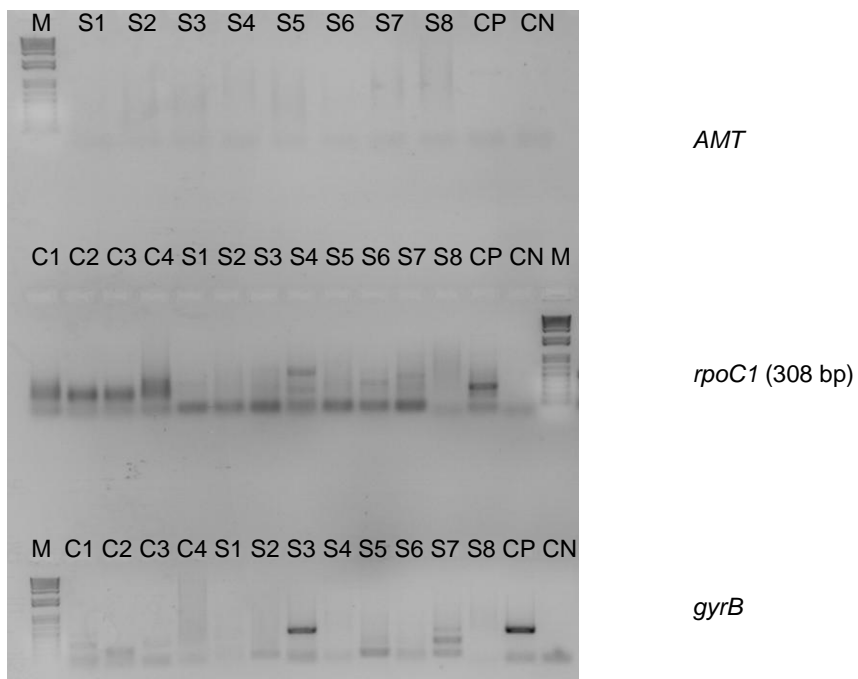
Anexo II

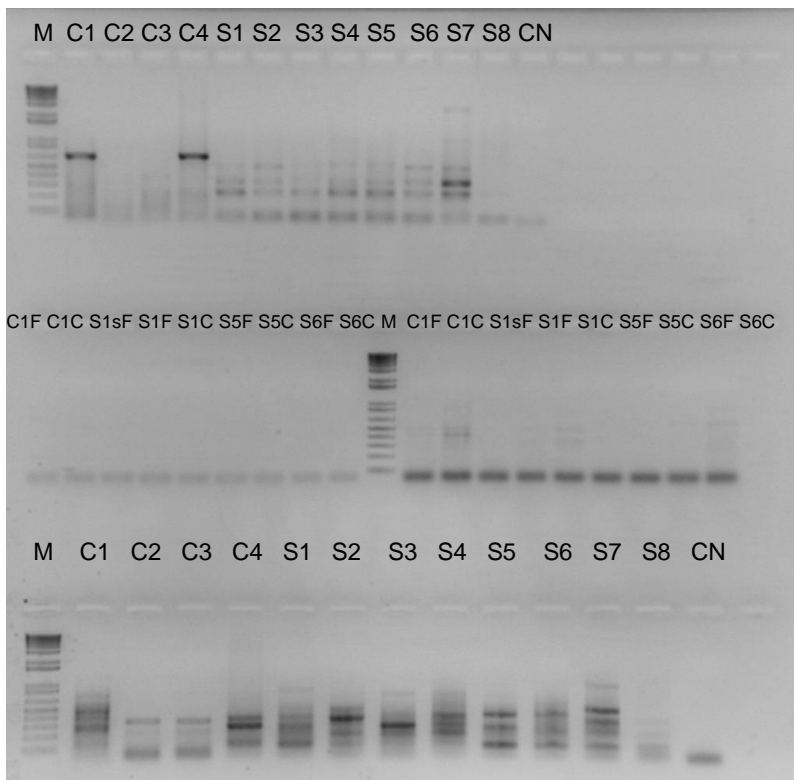
As imagens presentes neste anexo referem-se a alguns dos resultados da amplificação dos genes por PCR. As figuras correspondem aos resultados de PCR tanto para as amostras liofilizadas, como para os isolados. O marcador utilizado foi marcador 1Kb plus (Invitrogen - fragmentos de 100bp a 12Kb).







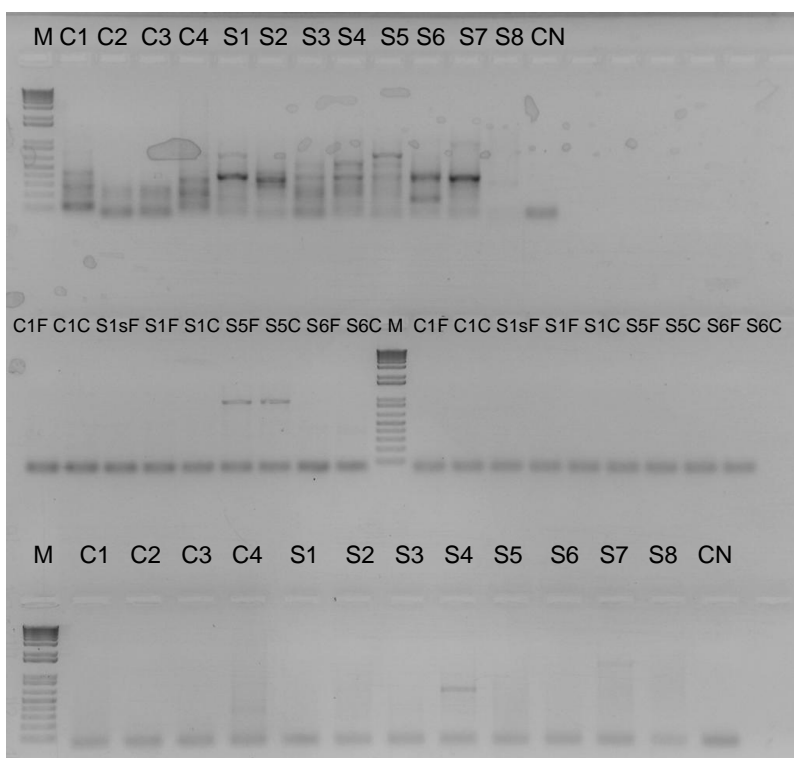




GADAB

GADAB e *PAL1*

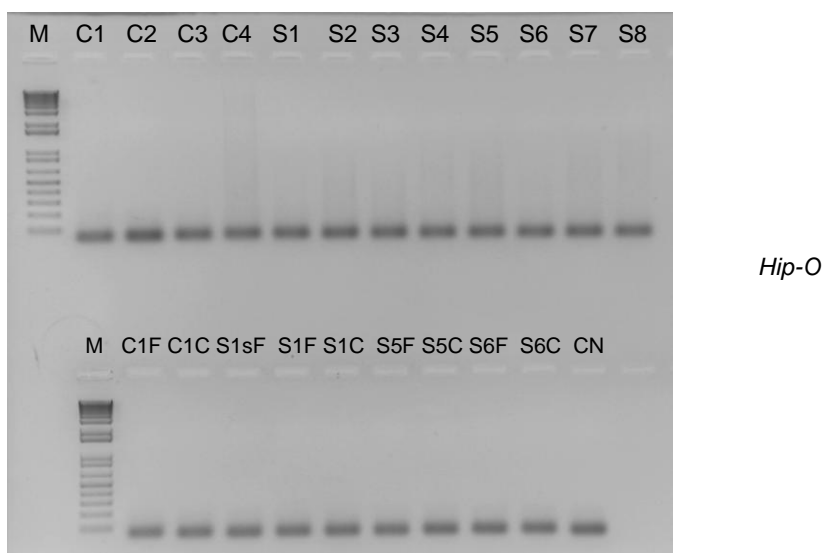
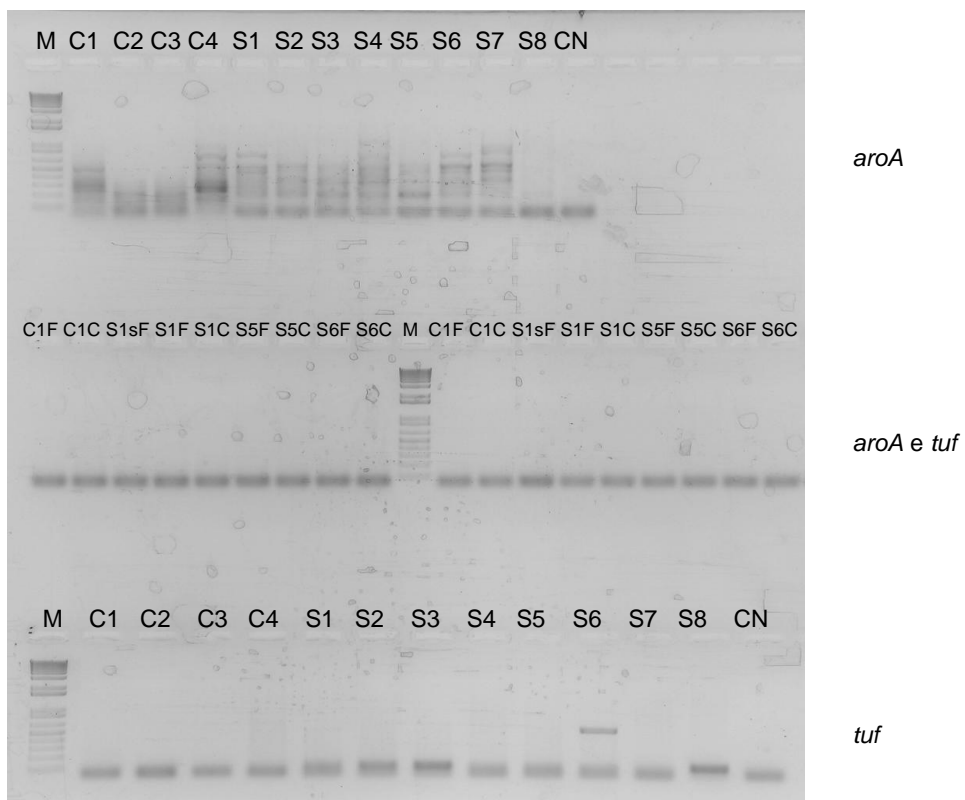
PAL1



INVA

INVA e *cpa*

cpa



A amostra descrita aqui como S5F não foi contabilizada, uma vez que se apresentava com contaminação fúngica

Anexo III

As sequências que se seguem referem-se às sequências amplificadas, através do gene *16S rRNA*, para determinação das espécies. Todas as sequências encontram-se no sentido 5'→3'.

16S - Amostras Liofilizadas (sequência consenso)

C1

CTTTCGCCTTTGGTGTTCCTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTCCACCGGAATTCCCTCTGCCCCCTACCGAACTCTAG
CTTGATAGTTTCTCCTGCCGGCCCGGGTTAAGCCCCGATCTTTGACAGGAGACTTGTCAAACCACCTACAGACGCTTTAC
GCCCAATCATTCGGATAACGCTTGCATCCTCTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGATGCTTATTCCTCAG
ATACCGTCAATTTTCTCTCTGAGAAAAGAAGTTTACAACCCACAGGCCCTTCATCCTTCACGCGGCATTGCTCCGTCAGG
CTTTCGCCCATTGCGGAAAATTCMTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCNCAGTGTGGCTGATC
ATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCATTGCCTTGGGAAGCTATTACCCACCACTAGCTAATCAGCCGCAAGCCCATCTTC
TGGCGATTATTTCATCATTCA

C4

ATGAATAATCGCCAGAAGATGGGCTTGCGMTGATTAGCTAGKWGGTGGGGTAATAGCTTCYCAAGGCAATGRTCAGTAGC
TGGKYTGAYARGRWGATCARCCRCAYTGGGRCTGAGACWCGMCCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCASTGAYGAATTTTCCG
CAATGGGCGRAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAARGATSAAGGCCTGTGGGTGGWAAMTCTTTTTCTCAGAGAAGAA
AAATTGACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTMACTCTGTGMCARCWGCCGCGTAAGACAGAGGATGCAAKCGTTATCC
GGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGTTTGACAAGTCTCCTGTCAAAGATCGGGGCTTAACCCCGGGCCGGCAGG
ARAACTATCAAGCTAGAGTTCGGTAGGGGCARAKGGAATTCGCGGTGGARCGGTGAAATGSGTAKATMTCGGGAGGAACA
CCAAAGGCGAAAGCACTC

S1

GTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATTTATC
GCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGC
AAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCAAGGAAGAACAATGACG
GTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATGATT
GGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTGGCTTAATACTGAAAGGCAGTGGAAGCTGA
ACAGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCGGTGGCG
AAAGCGTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATT

S2

GGTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATTTAT
CGCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
CAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCAAGGAAGAACAATGAC
GGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATGAT

TGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTGGCTTAACTACTGAAAGGCAGTGGAAACTG
AACAGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCGGTGGC
GAAAGCGCTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATT

S3

AGCGTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATTT
ATCGCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTG
AGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
CGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCAAGGAAGAACAATG
ACGGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATG
ATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTGGCTTAACTACTGAAAGGCAGTGGAAAC
TGAACAGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCGGTG
CGGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAACC

S4

CGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCG
AAAGGTAAAAGATTTATCGCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGA
TCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCA
AGGAAGAACAATGACGGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAA
GCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTAGCTCAACTACTG
AAAGGCAGTGGAACTGAACAGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCG
GGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTA
GATACCCAGTAGTC

S5

GGGTATCTAATCCCATTCGCTCCCCTAGCTTTCGTCCCTCAGTGTGAGTTACGGCCAGCAGAGCGCTTTCGCCACCGGTG
TTCTTCCCAGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCTACCGTACTCTAGCTGTTTCACTTTCCAC
TGCCTTTCAGTAGTTAAGCCACTGTCTTTGACAGCAGACTGAACAGCCACCTACGGACGCTTACGCCCAATCATTCCGG
ATAACGCTTGCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTTATTCCTCAAGTACCGTCATTGTGT
TCTTCTTGGAGAAAAGGGGTTTACAACCCAAGAGCCTTCTCCCCACGCGGTCTTGCTCCGTACGGCTTGCGCCATTGC
GGAAAATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAG
CTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGAGCTCATCTCCCGGCATAAATCTTT
TACCTTTCGGCTCATCCGGATTAGCAGAAGTTTCCCTCTGTTGTCCCCGACCGGGAGCCAGATTCTCAGCTACCCCCC
CCCC

S6

ACGCGTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATT
TATCGCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGG
GCGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCCTTTTCTCAAGGAAGAACAAT
GACGGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAAT
GATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTGGCTTAACTACTGAAAGGCAGTGGAAA
CTGAACAGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACAACCGGT
GGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCC

S7

GGGGGGGGGGGACGCGTGAGAATCTGGCTCCCGGTGCGGGACAACAGAGGGAACTTCTGCTAATCCCGGATGAGCCGA
AAGGTAAAAGATTTATCGCCGGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACCCCTTTTCTCAA
GGAAGAACAATGACGGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAG
CGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACAGTGGCTTAACTACTGA
AAGGCAGTGGAACTGAACAGCTAGAGTACGGTAGGGGACAGAGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGG
GAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGTAAGTACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG
ATCCC

S8

GTATCTAATCCCATTTCGCTCCCCTAGCTTTTCGTCCCTCAGTGTGAGTTACGGCCAGCAGAGCGCTTTCGCCACCGGTGTT
CTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCCACCGTACTCTAGCTGTTTCACTTCCACTG
CCTTTCAGTAGTTAAGCCACTGTCTTTGACAGCAGACTTGAACAGCCACCTACGGACGCTTACGCCAATCATTCGGAT
AACGCTTGCCCTCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTTATTCCTCAAGTACCGTCATTGTGTTT
TTCCTTGAGAAAAGGGGTTTACAACCAAGAGCCTTCCTCCCCACGCGGTCTTGCTCCGTGAGGCTTGCGCCATTGCGG
AAAATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCT
ACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGAGCTCATCTCCCGGCGATAAATCTTTTA
CCTTTCGGCTCATCCGGGATTAGCAGAAGTTTCCCTCTGTTGTCCCCGACCGGGAGCCAGATTCTCAGCGTTATC

As sequências que se seguem referem-se às sequências amplificadas, através do gene *16S rRNA*, para determinação dos gêneros/espécies dos isolados. Todas as sequências encontram-se no sentido 5'→3'.

16S - Isolados (sequência consenso)

C1F

TAATCCCATTCGCTCCCCTAGCTTTTCGTCCCTCAGTGTGAGTGCAGACCCAGTCACACGCTTTCGCCGCTGGTGTCTTCC
CAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGAATTCCTGTGACCCCTATCGCACTCGAGTTCTATAGTTTCTCTGCCTGT
ATGCAGTTAAGCTGCACGATTTGACAAAAGACTTATACAACCACCTACGGACGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGC
TTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTGATTCAATTAGGTACCGTCATCTTTCTTCCCT
AATAAAAGAGGTTTACACTCCAAAAAGCGTCCTCCCTACGCGGTATTGCTCCGTGAGGCTTGCGCCCATTCGCGAAAATT
CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGCTGCTCATCTCTCAGACCAAGTACAGAT
CGTAGGCTTGGTGTGCCATTACCACTCCAACCTAATCTGACGCGAGCCAATCTTTAGACGATAAATCTTTACCCCCAA
AAGGCACATTCGGTATTAGCAGACGTTTCCATCTGTTGTCCCCAATCTAAAGGCATGTTCTCAC

C1C (resultado da sequenciação com o *primer reverse*)

CGCTACACCGGGAATTCCTGCTGCCCCCTACCGCACTCTAGCTATACAGTTTCCACTGCCTGTTTCGGAGTTAAGCCGCGACC
TTTGACAGCAGACTTGAATTGCCACCTGCGGACGCTTACGCCAATGATTCCGGATAACGCTTGCTATCCTCCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTGATTCTCAGTACCGTCATTGTGTTCTTCCCTGAAAAAAGGATTTTACAA
CCCAAGAGCCTTCTTCCCCACGCGGTATTGCTCCGCCAGGCTTTCGCCCATTCGCAAAAATTCCCCAGTGTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGGTTGGCTGATCATCTCTCAAACCAGCTACTGATCGTCGCTTGGTAGGCTC

TTACCCACCAACTAGCTAATCAGACGCGAGCTCCCCTCTAGGATAATTTACTTTTACCTCTCGGCATATCGGGTCTTAGC
CACCGTTTCCAGTGGTTATCCCCGTCCTAAAGGCAGATTCTCACGCGTTACTCACCCGTCCG

C4C

CGCGTGAGAATCTGCCTTTTGGACCGGGACAACTGCGGGAAACGGCAGCTAAGACCGGATGTGCCTTCGGGTGAAATATTC
ATAGCCAAAAGAGGAGCTCGCGACCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCTGCGATCGGTAGCCGGTTTG
AGAGGACGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGCAATGA
CGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGA
TTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCACATCAAGTCTGCTGTCAAAGCCCCAGCTTAACTGGGAAGAGGCGGTGGAACT
GGTGAGCTAGAGAGCAATAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAAGAACACCAGTGG
CGAAAGCGCTCTACTAGGTTGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA

S1Fsal

GTGAGAATCTGCCCTTAGGAGGGGGATAACGACTGGAACGGTCGCTAATACCGCATATGCCGAGAGGTGAAAGGATTTAT
TGCCTGAGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
AAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAAGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCCCTTTTGACCGGGAAGAATACTGACGG
TACCGGTGCAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTATCAAGTCAGCTGTTAAAGCGTGGGGCTTAACTCCATAAGGGCAGTTGAAACTGAT
AGGCTAGAGTGCGATAGGGGCAAGGGGAATTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGA
AAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG

S1F

GAGAACATGCCTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTTAGGGGTGAAAGATTTTAT
TGTCTAAAGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAG
AGGATGACCAGGCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
CAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGACGCTTTTTGGAGTGTAACCTCTTTTATTAGGGAAGAATCGATGACG
GTACCTAATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTTAGTAAGTCTTTTGTCAAATCGTGCAGCTCAACTGCATACAGGCAGAGGAACTAC
TGAGCTAGAGTGCGATAGGGGTGACAGGAATTCCCAGTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGGCG
AAAGCGTGCTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAT

S1C

TAATCCCATTCGCTCCCCTAGCTTTTCGTCCCTGAGTGTGAGTTATGGCCTAGCAGAGCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCC
TGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCTCTGCCCCTACCATACTCTAGCTATTTCAGTTTCCACTGCCTGT
TCGGAGTTAAGCCCCGACCTTTGACAGCAGACTTGAATTGCCACCTGCGGACGCTTTACGCCCAATGATTCCGGATAACGC
TTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTGATTCTCAGGTACCGTCATTTTGTCTTCCC
TGAGAAAAGGAGTTTACAACCCAAGAGCCTTCCTCCCCACGCGGTATTGCTCCGTGAGGCTTTCGCCCATTGCGGAAAAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTACTGA
TCGTGCGCTTGGTAGGCTCTTACCCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGAGCTCCCCTCTAGGCTATAAATACTTTACCTC
TCGGCATATCGGGTCTTAGCCACCGTTTCCAGTGGTTATCCCCGTCCTAAAGCCAGATTCTC

S4C

CGCGTGAGAATCTGGCTTTAGGACGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAAGACCCGATATGCCGAGAGGTGAAAGTAAAT
TTAGCCTAGAGGGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTG
AGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
CGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATG
ACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATC
ATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCAATTCAAGTCTGCTGTCAAAGGTCGGGGCTTAACTCCGAACAGGCAGTGGAAAC
TGAATAGCTAGAGTGCGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTG
GCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA

S5Fsal (resultado da sequenciação com o *primer reverse*)

ATGTGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAGAGCTTACCAA
GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTC
TTTTCTCAAGGAAGAAGTACTGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCTGTGTAAGTCTGCTGTAAAGAATGAGGCTCA
ACCTCATCAAAGCAGTGGAACTACACGGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAT
GGGA

S5C

CGTGAGAATCTGGCTTTAGGACGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAAGACCCGATATGCCGAGAGGTGAAAGTAAAT
AGCCTAGAGGGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCG
AAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAACAACAATGAC
GGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCAT
TGGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCAATTCAAGTCTGCTGTCAAAGGTCGGGGCTTAACTCCGAACAGGCAGTGGAACTG
AATAGCTAGAGTGCGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGC
GAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGA

S6Csal

AGAATCTGGCTTTAGGACGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAAGACCCGATATGCCGAGAGGTGAAAGTATTTATAGC
CTAGAGGGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAA
GCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAACAAAATGACGGT
ACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGG
GCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCAATTCAAGTCTGCTGTCAAAGGTCGGGGCTTAACTCCGAACAGGCAGTGGAACTGAAT
AGCTAGAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAA
AGCGCTCTGCTAGGCCATAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAT

S6F

CGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGATGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCCAATGTGCCGAGAGGTGAAACATTT
ATGGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTA
AGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGG
CGCAAGCCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGACCTGA
CGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTA

TTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGTTGTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAAACT
GGGGAACCTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGG
CGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGAT

S6C

CGCGTGAGAATCTGGCTTTAGGACGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAAGACCCGATATGCCGAGAGGTGAAAGTATT
TATAGCCTAGAGGGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGG
GCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAACAAAAT
GACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAAT
CATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAATTCAAGTCTGCTGTCAAAGGTCGGGGCTTAACTCCGAACAGGCAGTGAAAA
CTGAATAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGT
GGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCATAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAT

As sequências que se seguem referem-se às sequências amplificadas, através dos diferentes genes utilizados para determinação das cianotoxinas e bactérias patogênicas nas amostras liofilizadas. Todas as sequências encontram-se no sentido 5'→3'.

Cianotoxinas e bactérias patogênicas - Amostras Liofilizadas (sequência consenso)

C1 - GADAB

AAATATGGTTGCCGATCTGTGGCATGCGCCTGCGCCGAAAAATGGTCAGGCCGTTGGCACCAACACCATTGGTTCTTCCGA
GGCCTGTATGCTCGGCGGGATGGCGATGAAATGGCGTTGGCGCAAGCGTATGGAAGCTGCAGGCAAACCAACGGATAAACCC
AAACCTGGTGTGCGGTCCGGTACAAATCTGCTGGCATAAATTCGCCCGCTACTGGGATGTGGAGCTGCGTGAGATCCCTAT
GCGCCCCGCTCAGTTGTTTATGGACCCGAAACGCATGATTGAAGCCTGTGACGAAAACACCATCGGCGTGGTGCCGACTTT
CGGCGTGACCTACACYGGTAACTATGAGTTCCCAACAACCGCTGCACGATGCGCTGGATAAATTCAGGCCGAYACCGGTAT
CGACATCGACATGCACATCGACGCTGCCAGCGGTGGCTTCCTGGCACCGTTCGTCGCCCCGGATATCGTCTGGGACTTCCG
CCTGCCGCGTGTGAAATCGATCAGTGCTTCAGGCCATAAATTCGGTCTGGCTCCGCTGGGCTGCGGCTGGGTTATCTGGCG
TGACGAAGAAGCGCTGCCGCAGGAACCTGGTGTTCACGTTGACTACCTGGGTGGTCAAATTTGGTACTTTTGCCATCAACTT
CTCCCC

C4 – GADAB

TGACCGGGGCGCATAGGGATCTCACGCAGCTCCACATCCAGTAGCGGGCGAATTTATGCCAGCAGATTTGTACCGGACCG
CACACCAGTTTGGTTTATCCGTTGGTTTGCTGCAGCTTCCATACGCTTGCGCCAACGCCATTTTCATCGCCATCCCGCCG
AGCATACAGCCTCGGAAGAACCAATGGTGTGGTGCCAACGGCCTGACCATTTTTCGGCGCAGGCGCATGCCACAGATCG
GCAACCATATTTACGCAACGC

S3 – *mcyA*

CGGCTCATTTTCGGGTATTAAAGTTTACTGAATAATCAGAGGGATATTGTTACGGGTTTAGTCTCTAATGGACGGTTAGAAG
CAGCCGATGGTGAAAAGATATTAGGTTTATTTTTGAATACTTTGCCCTACGTTTAGAGTTATCTGGAGGCCCTTGGAGCG

ATTTAGTTAAGCAAGCTTTTGATGTTGAAAGAGAATGCTTATCTTGGCGAAGATATCCCCTCGCTGAGTTACAAAAATCAG
GTCAACCTTTGTTTGATA

S3 - *mcyE* | *ndaF*

GTAAATCGGGTTTGCGACTTTGAACTGGTTCGACTAATACGGCAGCTAAATCATCAGCATGAGTAGCAATAATATCGAGGC
TTTCTTCAACTCCATAACTCAAGACTATTATGTCTTCAACCATTCCTAAAGGAGTGCCTAAACTTAAGGGTTGAGTCGTGG
TTTTATCTTCTCCTACTCGTGCTAAGATGCCGTCAAAAGTTCCATGGTAGGAGCCGGCAAACATAACAATTTTTTGACGTT
TTGTCCGGGAGCGAGCAATGCGAACAGCYGCCATAATCGCCTCGGTTCCCGTATTACTAAAAGCGACTCTTTCGACCCGGC
CCATTTCACTAATTAAAGCGGCGGTTTCGGCGGCCAGATTTGACTGCATTCCCTAAGCCTATTCCTCGATTCAATTTGTTCTT
GAACTGCTTCAATGACAAAATCAGGACTATGGCCAAAAA

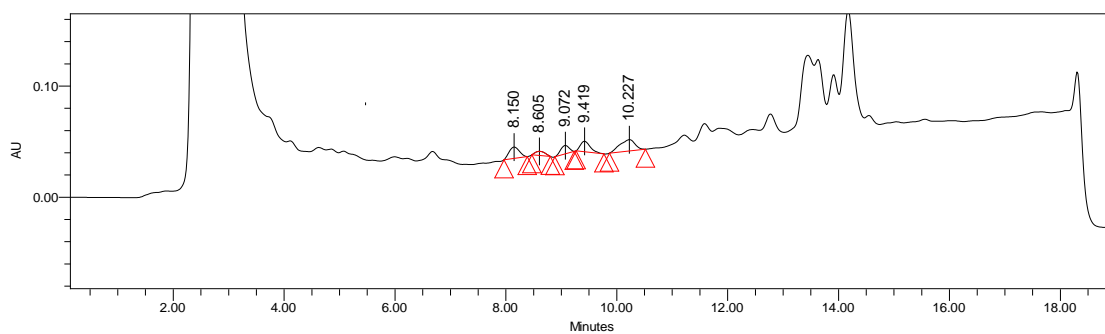
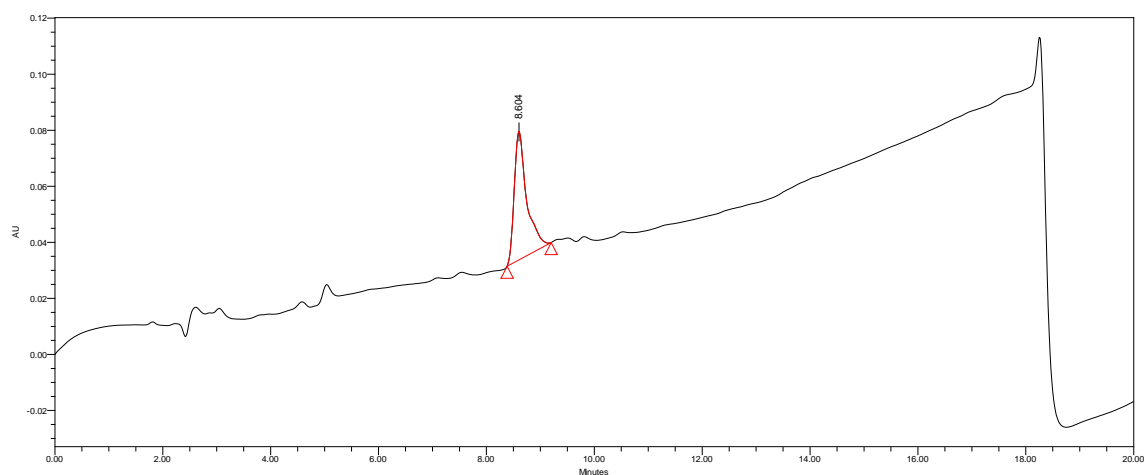
S7 - *gyrB*

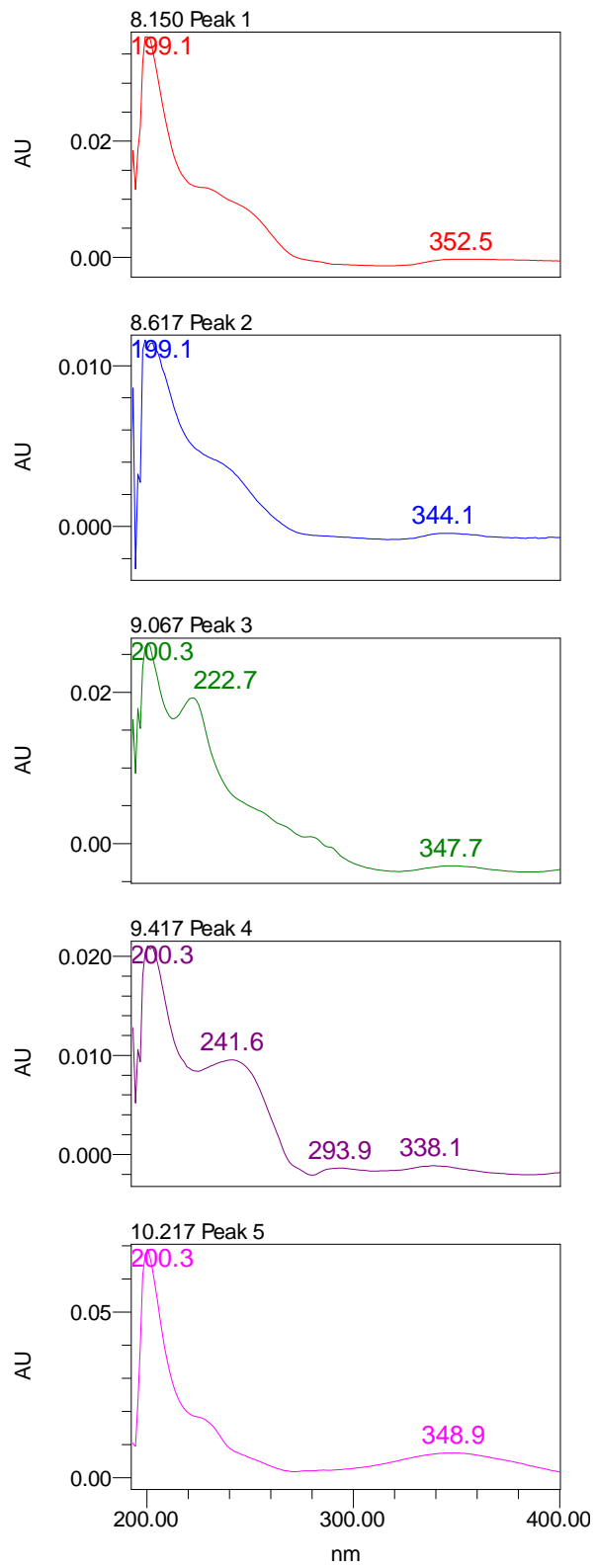
CATTACTCTCACCGATAACAGGCTGGAGTTACTCAAACGGGAAGAGGCTAAGGTTGAGAGTTACTGTTACGAGGGGGGCAT
TAAGGAATATGTTACCTACATGAACCGGGAAAAGCAGGCTCTCCACGAAGATACTATTTATGTGTCTGGTGAACGCAATAA
TGTTTCAGGTGGAAGTGGCTCTACAGTGGTGTGTTGATGCCTACAGCGACACGATTTTGGGTTTGCTAACAATATCCGCAC
CGTTGATGGTGGTACCCATTTGGAAGGGCTGAAAACGTGTTCTGACTCGCACCATGAATGCGATCGCCCGTAAGCGTAATAA
GATTAAGGATAATGAGCCTAACCTGGGGGGGAAAATGTCCGGGAAGGTTTGACTGGGGTGATTTCTGTTAAGGTTTCCT

Anexo IV

As imagens seguintes referem-se aos cromatogramas obtidos por HPLC para as amostras liofilizadas (S3 e S7)

HPLC – amostra liofilizada S3 - Microcistina (purificado)





HPLC – amostra liofilizada S7 - Cilindrospermopsina (purificado)

